

Aus der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Gramatzki)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

HM1.24 GERICHTETE BISPEZIFISCHE SINGLE-CHAIN-FV ANTIKÖRPER ZUR THERAPIE DES MULTIPLN MYELOMS

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
CLAUDIA EHLERT

aus Pritzwalk

Kiel 2009

1. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. R. Repp

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22. September 2010

gez.: Prof. Dr. Dr. M. Kneba

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Multiples Myelom.....	1
1.1.1	Diagnose und Stadien.....	2
1.1.2	Therapie des Multiplen Myeloms	4
1.1.2.1	Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation.....	4
1.1.2.2	Konventionelle Chemotherapie und neue Substanzen.....	5
1.1.2.3	Allogene Stammzelltransplantation (experimentell)	6
1.1.2.4	Zusatztherapeutika.....	6
1.1.3	Limitierungen der Therapie und neue Therapieansätze.....	7
1.2	Antikörpertherapie.....	9
1.2.1	Therapie mit monoklonalen Antikörpern	9
1.2.2	Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper	11
1.2.3	Zielstrukturen auf malignen Plasmazellen.....	13
1.2.4	HM1.24 als Zielstrukturen auf Myelomzellen.....	15
1.3	Bedeutung von Fc-Rezeptoren	16
1.4	Bispezifische Antikörper.....	16
1.4.1	Zielstrukturen auf Effektorzellen	17
1.4.2	Herstellung bispezifischer Antikörper.....	19
1.5	Rationale und Ziele der Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1	Materialien	23
2.1.1	Chemikalien.....	23
2.1.2	Puffer und Lösungen	23
2.1.3	Vektoren	25
2.1.4	Bakterienstämme.....	25
2.1.5	Zelllinien	26
2.1.6	Zellkulturmedien.....	26
2.1.7	Antikörper.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Expression des HM1.24-gfp+, HM1.24-Fc, bsscFv in Säugetierzellen	28
2.2.2	Aufreinigung des HM1.24-gfp+, HM1.24-Fc, bsscFv	28
2.2.3	Gelelektrophorese	29
2.2.3.1	Coomassie-Färbung von Proteingelen	29
2.2.3.2	Western Transfer	29
2.2.4	Durchflußzytometrie	30

2.2.5	Vollblut-Analysen mittels Durchflußzytometrie.....	30
2.2.6	Zytotoxizitätsexperimente	31
2.2.6.1	Isolation von Effektorzellen aus Vollblut	31
2.2.6.2	Isolation von Tumorzellen aus Vollblut von Tumorpatienten.....	31
2.2.6.3	ADCC-Reaktionen.....	31
2.2.6.4	Statistische Analyse	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Untersuchung hämatopoetischer Zellpopulationen auf ihre Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche mit direkt markierten HM1.24-FITC.....	33
3.1.1	Herstellung eines direkt markierten HM1.24 mit FITC und Nachweis der spezifischen Bindung	33
3.1.2	Untersuchung hämatopoetischer Zellpopulationen auf ihre Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche	34
3.2	Analyse potentieller Effektormechanismen von humanisierten HM1.24-gerichteten IgG1-Antikörpern.....	37
3.3	Konstruktion und Charkterisierung eines HM1.24-spezifischen scFv Fragments	38
3.4	Konstruktion des rekombinaten bsscFv [HM1.24xCD16].....	42
3.4.1	Expression und Reinigung.....	43
3.4.2	Nachweis spezifischer Bindung des bsscFv	44
3.5	Vermittlung von Zytotoxizität durch den bispezifischen scFv HM1.24xCD16	45
3.5.1	Tumorzelllyse von Myelomzellen.....	50
3.5.2	Zytotoxische Aktivität des bsscFv [HM1.24xCD16] gegenüber primären humanen Tumorzellen.....	54
4	DISKUSSION	57
4.1	HM1.24 als geeignetes Zielmolekül.....	58
4.1.1	Expressions-Profil.....	58
4.1.2	HM1.24-Antikörper Therapie.....	59
4.2	CD16 als Antigen auf Effektorzellen/NK-Zellen	60
4.2.1	Weitere Effektorzellpopulationen	61
4.3	Bispezifische Antikörper	62
4.3.1	Pharmakokinetik bispezifischer Antikörper	63
4.4	Immunogenität.....	65

5	ZUSAMMENFASSUNG	67
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
7	WEITERE INFORMATIONSQUELLEN.....	80
	DANKSAGUNG.....	81
	LEBENS LAUF	82
	PUBLIKATIONEN.....	83

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
a.d.	<i>aqua ad injectionem</i>
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>)
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zellen
BR	<i>Basal Release</i>
BSA	bovines Serum-Albumin
bsAk	bispezifische Antikörper
bsscFv	bispezifischer single-chain Fv
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität (<i>complement dependent cytotoxicity</i>)
CDR	<i>complementary-determining region</i>
Ci	Curie
clg	cytoplasmatisch exprimiertes Immunglobulin
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
cpm	<i>counts per minute</i>
Cr	Chrom
dl	Dezi-Liter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBMT	<i>European Group for Blood & Marrow Transplantation</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
F(ab)	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
Fc	konstante Domäne eines Antikörpers (<i>fragment crystalizable</i>)
FcR	Fc-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
FS	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gly	Glycin
GM-CSF	<i>granulocyte-monocyte/makrophage colony stimulating factor</i>
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (<i>Graft-versus-Host-Disease</i>)
h	Stunde
HAHA	<i>human-anti-human(ized) antibody</i>

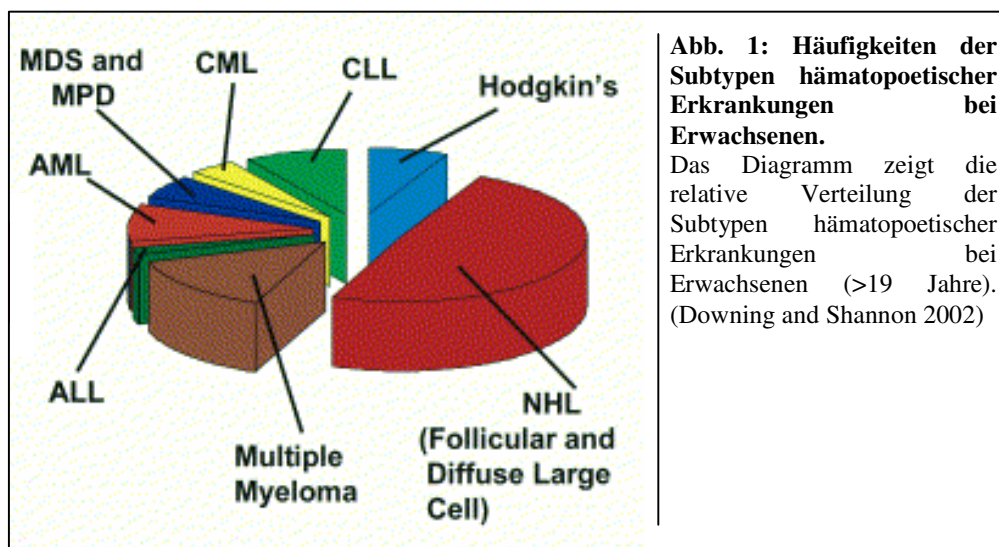
HAMA	<i>human anti-mouse antibody</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISS	<i>International Staging System</i>
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LAK	<i>lymphokine-activated killer</i>
M	Molar
MAK	Membran-Aktivierungs-Komplex
mg	Milligramm
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Multiple Myelom
MNC	mononukleäre Zellen (<i>mononuclear cells</i>)
MP	Melphalan/Prednisolon
MR	<i>Maximal Release</i>
MRD	Minimale Resterkrankung (<i>minimal residual disease</i>)
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
PBL	<i>peripheral blood leukocytes</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PMN	polymorphnukleäre Zellen (<i>polymorphnuclear cells</i>)
RFI	<i>relative fluorescence intensity</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rotations per minute</i>
SCCHN	<i>squamous-cell-carcinoma of head and neck</i>
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
scFv	<i>single-chain Fragment variable</i>
SDS-Page	<i>sodiumdodecylsulfate-polyacrylamidegelelectrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
Ser	Serin
slg	membranständiges Immunglobulin
SS	<i>sideward scatter</i>
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
v.a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VH	variable Region der schweren Immunglobulinkette
VL	variable Region der leichten Immunglobulinkette
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)

1 EINLEITUNG

1.1 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (Synonym: MM; Morbus Kahler) und das solitäre Plasmozytom sind maligne Erkrankungen der B-Zell-Reihe und gehören nach der WHO-Klassifikation zu den B-Zell-Lymphomen (niedrig-malignen Non-Hodgkin Lymphom (NHL)).

Im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen (Brustkrebs, Darmkrebs, Lungenkrebs) ist das Multiple Myelom eine seltene Erkrankung, stellt jedoch das häufigste primär am Knochen lokalisierte Tumorleiden dar. In Europa erkranken von 100.000 Menschen pro Jahr etwa 4 Menschen an einem Multiplen Myelom. Das Multiple Myelom macht damit rund 1% aller Tumorerkrankungen des Menschen und ca 10% aller bösartigen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems aus. Es ist typischerweise eine Erkrankung des älteren Menschen. Die Inzidenz steigt mit dem Alter an, ca. 75% der Patienten sind über 60 Jahre alt.



Das Multiple Myelom ist gekennzeichnet durch diffuse oder multilokuläre Infiltration des Knochenmarks durch klonale Plasmazellen, die den Knochen zerstören und die normale Blutbildung verdrängen. Folge dessen ist Insuffizienz der Hämatopoese sowie Osteolysen. Die

meisten Plasmazellklone produzieren immuninkompetente, monoklonale Immunglobuline (komplette Immunglobuline, meist Typ IgG oder IgA, und/oder Immunglobulin-Leichtketten von λ - oder κ -Typ), die sowohl im Serum als auch im Urin nachweisbar sind (monoklonale Gammopathie). Die Ursachen für die Entstehung sind noch ungeklärt.

Typische Symptome sind Knochenschmerzen, pathologische Frakturen, Zeichen der Anämie und erhöhte Infektanfälligkeit (Antikörpermangel-Syndrom). Nierenfunktionsstörungen können Folge einer Hyperkalziämie oder einer tubulären Schädigung durch die Ausscheidung von Leichtketten sein.

Vom Multiplen Myelom müssen die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) sowie das Smoldering Myelom abgegrenzt werden. Die MGUS, die häufigste Gammopathie, ist durch das Vorliegen von monoklonalen Immunglobulinen im Serum charakterisiert. Laut Definition muss der Plasmazellanteil im Knochenmark unter 10% liegen sowie die monoklonalen Immunglobuline eine konstant niedrige Konzentration ($<30\text{g/l}$) aufweisen. Ebenso fehlen hier sonstige für das Multiple Myelom typische Erkrankungserscheinungen wie Hyperkalziämie, Anämie, Niereninsuffizienz und Knochenschädigungen. MGUS gilt als prämales Stadium und geht mit einer Häufigkeit von etwa 1% pro Jahr in eine maligne B-Zell-Erkrankung, meist ein Multiples Myelom, über (Kyle 1993). Unter einem "Smoldering Multiple Myeloma" (SMM) versteht man eine kleine Untergruppe von Patienten mit multiplem Myelom im frühen Stadium mit asymptomatischer Erkrankung, die über Jahre ohne Therapie stabil bleiben kann (Kyle, Remstein et al. 2007). Die Plasmazellen können Malignitätskriterien aufweisen, haben jedoch immer einen niedrigen Proliferationsindex. Charakterisiert ist das SMM durch eine Erhöhung der Konzentration der monoklonalen Immunglobuline ($>30\text{g/l}$) oder durch eine Erhöhung des Plasmazellanteils im Knochenmark über 10%. Auch hier fehlen die für das Multiple Myelom typischen Endorganmanifestationen. Bezüglich der Therapie sollte ebenso wie bei Patienten mit MGUS unter Beobachtung abgewartet werden (Kyle and Rajkumar 2008).

1.1.1 Diagnose und Stadien

Zur Diagnose des Multiplen Myeloms müssen folgende Kriterien vorliegen: 1. Nachweis monoklonaler Immunglobuline im Serum und/oder Urin, 2. Plasmazellanteil im Knochenmark

>10% und 3. Endorganschäden, die sich manifestieren können durch: Hyperkalziämie, Niereninsuffizienz, Anämie oder Knochenläsionen (International Myeloma Working Group 2003).

Die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (siehe Tabelle) lässt eine grobe Abschätzung der Tumorzellmasse zum Zeitpunkt der Diagnose zu, und hat somit Bedeutung für Prognose und Therapie. Weitere Risikofaktoren sind die Erhöhung der Konzentration des Serum- β 2-Mikroglobulin, als Maß für die Tumormasse, und der Nachweis bestimmter Veränderungen des Tumorzellgenoms (Monosomie 13/13q-Deletion, Deletion 17q13, Translokation t[4;14], hypodiploider Chromosomensatz).

	Durie und Salmon	ISS
Stadium	Merkmale	
Stadium I	Alle folgenden Kriterien sind erfüllt: - Hämoglobin > 10g/dl - Serumkalzium normal - normale Knochenstruktur oder nur ein solitärer Herd - niedrige Myelomproteinkonzentration: - IgG < 50g/l (Serum) - IgA < 30g/l (Serum) - Bence-Jones-Protein < 4g/24h (Urin)	Serum β 2-Mikroglobulin > 3,5mg/l Serum Albumin < 3,5g/dl Medianes Überleben: 62 Monate
Stadium II	Weder Stadium I noch Stadium III	Weder Stadium I noch Stadium III Medianes Überleben: 44 Monate
Stadium III	Mindestens eines der folgenden Kriterien ist erfüllt: - Hämoglobin < 8,5 g/dl - Serumkalzium erhöht - mehrere Osteolysen - hohe Myelomproteinkonzentration: - IgG > 70g/l (Serum) - IgA > 50g/l (Serum) - Bence-Jones-Protein > 12g/24h (Urin)	Serum- β 2 Mikroglobulin > 5,5 mg/l Medianes Überleben: 29 Monate
Zusatz	A= Kreatinin < 2mg/dl (normale Nierenfunktion) B = Kreatinin > 2mg/dl (eingeschränkte Nierenfunktion)	

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Plasmozytoms nach Durie und Salmon und ISS

Mit dem internationalen Einteilungssystem ISS (International Staging System) wird zurzeit die Einführung einer neuen aktualisierten Klassifikation überprüft. Dieses basiert auf β 2-

Mikroglobulin- und Albuminspiegel im Serum und teilt MM-Patienten in 3 Risiko- oder Prognosegruppen ein (Greipp, San Miguel et al. 2005).

Die mediane Überlebenszeit ist abhängig vom Diagnosezeitpunkt, vom Erkrankungsstadium, sowie von bestimmten Prognosefaktoren. Sie beträgt bei konventioneller Chemotherapie etwa 3-4 Jahre, bei Hochdosis-Chemotherapie etwa 5 Jahre (Singhal and Mehta 2006). Für unbehandelte Myelome, vor Einführung der Chemotherapie, wurden mittlere Überlebenszeiten von 6 bis 12 Monaten beschrieben (Osgood 1960).

1.1.2 Therapie des Multiplen Myeloms

Die Entscheidung über eine geeignete Behandlung hängt von verschiedenen Faktoren ab: Stadium der Erkrankung, Alter, Begleiterkrankungen und Myelom-Komplikationen. Generell wird eine Behandlung bei symptomatischer Erkrankung, z.B. bei Anämie, Knochenschmerzen begonnen. Patienten mit asymptomatischem Myelom oder mit Myelom im Stadium I sind zum Zeitpunkt der Diagnose nicht behandlungsbedürftig, müssen aber im weiteren Verlauf sorgfältig beobachtet werden. Dagegen ist bei symptomatischen Patienten im Stadium II sowie im Stadium III immer eine Behandlung notwendig.

1.1.2.1 Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation

Als therapeutische Option (für die Erstbehandlung) für Myelompatienten steht derzeit vor allem die Chemotherapie im Vordergrund. Die Behandlung mit Zytostatika kann entweder im Rahmen einer konventionellen Chemotherapie erfolgen oder auch als Hochdosis-Chemotherapie mit Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation. Für Patienten im Alter unter 65-70 Jahren, ohne zusätzliche schwerwiegende Organschädigungen, gilt heute primär die Chemotherapie, gefolgt von einer Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation als Methode der Wahl, mit dem Ziel der Langzeitremission. Durch die Chemotherapie sollen die Tumorzellen in den zu gewinnenden Stammzellen (Transplantat) reduziert werden. Nach der Stammzellgewinnung schließt sich die Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan an, mit dem Ziel die gesamten Zellen des Knochenmarks zu eliminieren. Durch diese Therapie werden auch die gesunden Knochenmark- und Stammzellen des Patienten zerstört, um den Patienten für die

Stammzelltransplantation vorzubereiten. Anschließend werden dem Patienten die autologen hämatopoetischen Stammzellen per Infusion transfundiert. Diese Stammzellen siedeln sich im Knochenmark an und beginnen dort schon nach kurzer Zeit mit der Proliferation und Rekonstruktion des hämatopoetischen Systems. Wird durch die Therapie noch keine weitgehende Remission erreicht, kann eine zweite Hochdosistherapie angeschlossen werden (sogenannte Tandem-Transplantation). In Studien konnte gezeigt werden, dass bei mehr Patienten eine komplette Remission sowie ein längeres Überleben durch eine zweite Stammzelltransplantation erreicht wurde (Harousseau, Shaughnessy et al. 2004). Bei älteren Patienten (bis 70-75 Jahre) ist auch eine altersadaptierte, dosisreduzierte Hochdosis-Chemotherapie mit Transplantation autologer Blutstammzellen möglich, jedoch ist hier die Indikation unter Berücksichtigung des biologischen Alters sowie der Komorbidität zu stellen.

1.1.2.2 Konventionelle Chemotherapie und neue Substanzen

Als Standardtherapie für Patienten über 65-70 Jahre oder für Patienten, die aufgrund von Begleiterkrankungen nicht für eine intensive Therapieform in Frage kommen, gilt die konventionelle (palliative) Chemotherapie mit dem Ziel der Verbesserung oder der Erhaltung der Lebensqualität. Hierbei wird zur initialen Remissionsinduktion das MP-Schema nach Alexanian mit Melphalan und Prednison verwendet. Moderne Therapiekonzepte kombinieren das MP-Schema mit neuen Substanzen, wie Thalidomid (MPT (Melphalan/Prednison/Thalidomid)) oder Bortezomib (VelcadeTM) (VMP (Bortezomib/Melphalan/Prednison)). Anthrazyklinhaltige Schemata (z.B. VAD (Vinchristin/Adriamycin/Dexamethason), VID, ID) sind kaum mehr von Bedeutung. Für Patienten über 80-85 Jahre sind Schemata wie MP, Bendamustin/Prednison oder Cyclophosphamid/Prednison möglich.

Thalidomid ist in Kombination mit MP für die Erstlinientherapie von Patienten, die für eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender Blutstammzelltransplantation nicht in Frage kommen, zugelassen. Durch Hemmung der Angiogenese bewirkt Thalidomid eine Reduktion der gesteigerten Gefäßdichte und der Blutversorgung in Myelomherden. Lenalidomid (RevlimidTM), ein Thalidomidanalogon, ist in Kombination mit Dexamethason zur Behandlung des rezidierten/refraktären MM zugelassen.

Der Proteasomeninhibitor Bortezomib führt zur Blockierung von Signalkaskaden innerhalb der Zelle und verändert Regulatorproteine, die den Verlauf des Zellzyklus regulieren, was schließlich zu einem Stillstand des Zellzyklus und zu Apoptose führt. Es ist derzeit für die Behandlung des rezidierten/refraktären MM zugelassen, sowie als Kombinationstherapie mit Dexamethason.

Das Therapieansprechen wird nach den EBMT-Kriterien beurteilt (Blade, Samson et al. 1998). Hauptparameter des Therapieansprechens ist die Reduktion des M-Proteins, welches in der Regel mit der Reduktion der Tumormasse eng korreliert.

1.1.2.3 Allogene Stammzelltransplantation (experimentell)

Eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender allogener Blutstammzelltransplantation von Familien- oder Fremdspendern stellt derzeit die einzig kurative Behandlungsoption für Patienten mit Multiplen Myelom im fortgeschrittenen Stadium dar. Ziel ist es eine Immunreaktion der Spenderleukozyten gegen die Myelomzellen des Patienten zu induzieren (Transplantat gegen Myelom Effekt, *Graft-versus-myeloma-effect*). Im Gegensatz zur autologen Transplantation, bei der die behandlungsassoziierte Mortalität gering ist (2-3%), stellt die allogene Transplantation eine Therapie mit hohem Risiko dar. Diese sehr hohe therapiebedingte Frühsterblichkeit, die bei 15-25% liegt, ist vor allem durch die hohe Inzidenz der akuten und chronischen Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion bedingt. Die sogenannte „Mini-Transplantation“, eine weniger intensive Chemotherapie vor Stammzelltransplantation, wird derzeit in klinischen Studien überprüft.

1.1.2.4 Zusatztherapeutika

Myelome sind strahlensensibel, weshalb die Strahlentherapie eine wichtige Behandlungsoption darstellt. Die Bestrahlung wird unter anderem angewendet bei drohenden oder manifesten Komplikationen an Skelett oder neurogenen Strukturen. Ein Nachteil der Bestrahlung liegt in der Schädigung gesunder Knochenmarkszellen im Bestrahlungsfeld, weshalb ausgedehnte Bestrahlungsfelder vermieden werden. Eine Bestrahlung hat außerdem analgetische Effekte und ist bei starken Skelettschmerzen indiziert.

Bei Knochenbeteiligung ist eine Langzeittherapie mit Bisphosphonaten indiziert. Bisphosphonate hemmen die osteoklastenvermittelte Knochenresorption (Verbesserung der Knochendichte und -

stärke) und führen somit zu einer Reduktion von pathologischen Frakturen und Knochenschmerzen.

Der Einsatz von Erythropoetin ist bei Anämie, insbesondere bei begleitender chronischer Niereninsuffizienz, indiziert.

1.1.3 Limitierungen der Therapie und neue Therapieansätze

Zielzellen der Zytostatika sind solche, die eine hohe Proliferationsrate besitzen. Demnach wirken Zytostatika nicht nur auf Krebszellen, sondern auch auf normale, schnellproliferierende Zellen des Körpers. Zu diesen Zellen gehören hauptsächlich Zellen des Gastrointestinaltraktes, der Haarfollikel und des hämatopoetischen Systems. Daher treten Nebenwirkungen häufig in Form von Übelkeit, Erbrechen, Haarausfall, Schleimhautentzündungen von Mund, Speiseröhre und Darm, sowie Menstruations- und Keimzellstörungen auf.

Ebenfalls kommt es unter Chemotherapie zu einer weiteren Verschlechterung der Blutwerte. Durch Granulozytopenie und Lymphozytopenie wird die körpereigene Immunabwehr zusätzlich abgeschwächt, woraus eine erhöhte Infektionsgefahr resultiert, die in Einzelfällen lebensbedrohlich sein kann. Weiterhin kommt es unter Chemotherapie zur Anämie und zur Thrombozytopenie, was zu einer erhöhten Blutungsneigung führt.

Die Transplantation mit Stammzellen kann schwerwiegende Nebenwirkungen zur Folge haben. Bei allogenen Transplantationen kommt es häufig zu einer Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (*graft versus host disease*; GvHD), bei der die Spender-Immunzellen die Zellen des Empfängers als fremd erkennen und zytolytische Prozesse auslösen. Diese sind hauptsächlich gegen Haut, Leber und Darm gerichtet.

Das Multiple Myelom ist bisher in der Regel nicht heilbar. Die Therapie ermöglicht jedoch bei der Mehrzahl der Patienten vorübergehende Remissionen. Dennoch kommt es nach unterschiedlichen Zeitintervallen fast immer zur Progression. Der Verlauf kann durch Chemotherapie verlangsamt werden. Ohne Behandlung liegt das Überleben des aktiven Myeloms im Median bei 6 Monaten. Die Behandlung mit Melphalan/Prednison verlängert das mediane Überleben auf 3 Jahre. Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation verbessert das mediane Überleben weiter auf 5 Jahre (Singhal and Mehta 2006).

Die Behandlung hat in den letzten Jahrzehnten durch verbesserte Chemotherapie und Stammzelltransplantation erhebliche Fortschritte erzielt. Dennoch sprechen einige Patienten nur schlecht oder gar nicht auf die verabreichte Therapie an. Andere sprechen zwar auf die Therapie an, erleiden jedoch einen Rückfall trotz kompletter klinischer Remission aufgrund von sogenannter *Minimal-Residual-Disease* (MRD), minimaler Resterkrankung. Hierbei handelt es sich um Myelomzellen, die im Verlauf der Therapie nicht eliminiert wurden und durch erneute Expansion zu einem Rückfall der Erkrankung führen. Die MRD-Zellen, die das Rezidiv verursachen, sind häufig resistent gegenüber Chemotherapeutika. Daher besteht Bedarf an der Entwicklung neuer Therapeutika mit zielgerichteten Wirkmechanismen. Ziel neuer Therapieansätze muss sein, entartete Zellen selektiv zu attackieren und gesundes Gewebe unbeeinträchtigt zu lassen.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen der Myelomzellen mit den Stromazellen des Knochenmarks sowie ihre Signalkaskaden, bei denen Zytokine Wachstum, Überleben und Therapieresistenzen gegenüber konventionellen Therapeutika vermitteln, von zentraler Bedeutung sind. Neue Wirkstoffe, wie unter anderem die schon in der Klinik zugelassenen Imide und Bortezomib, wurden entwickelt, um die Interaktionen der Myelomzellen mit ihrer Mikroumgebung im Knochenmark zu unterbrechen (Harousseau, Shaughnessy et al. 2004; Chng, Lau et al. 2005; Terpos, Rahemtulla et al. 2005). Für das Wachstum von Myelomzellen spielt Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle. Daher wird auf verschiedenen Wegen versucht, die IL-6 Sekretion durch direkte oder indirekte Inhibitoren zu unterdrücken (Honemann, Chatterjee et al. 2001). Arsen-trioxid führt ebenfalls zur Störung der Interaktion der Myelomzellen mit ihrer Mikroumgebung im Knochenmark (Hemmung der IL-6- und VEGF-Sekretion). Diese und weitere neuartige Therapeutika als Ergänzung bzw. als zusätzliche Therapieoption zur Behandlung des Multiplen Myeloms werden in zahlreichen klinischen Studien untersucht.

Durch enorme Fortschritte in der Therapie des Multiplen Myeloms konnte bei mehr Patienten eine klinisch komplette Remission erzielt werden, was aber immer noch keine Heilung bedeutet. Von zentraler Bedeutung ist die minimale Resterkrankung, die zu einem erneuten Ausbrechen der Krankheit führt. Neue zielgerichtete Therapieansätze, wie Immuntherapeutika, sind als Chance zu sehen, MRD-Zellen zu eliminieren.

1.2 Antikörpertherapie

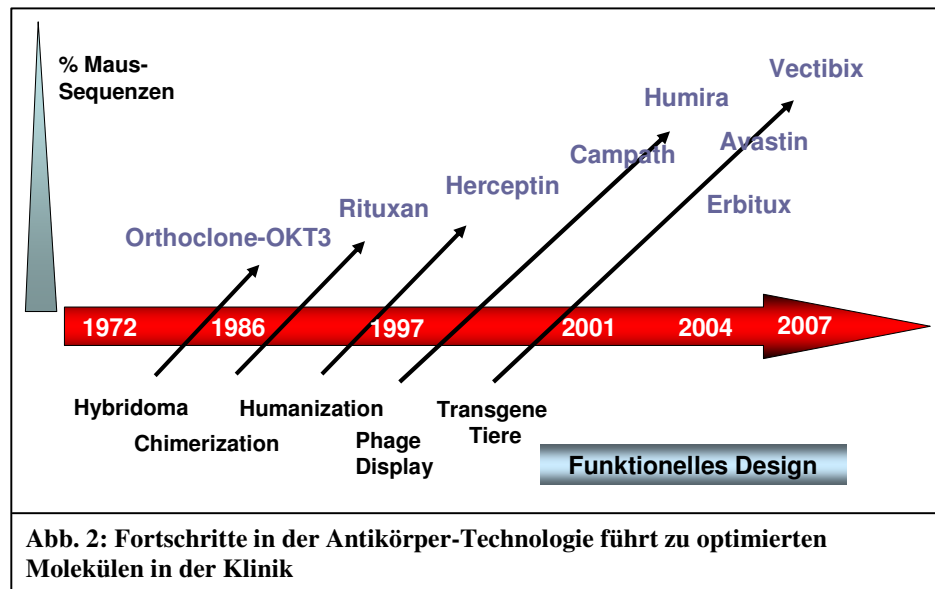
Ein weiterer vielversprechender Weg ist der Einsatz von Antikörpern. Diese sind in der Lage durch ihre hohe Antigenspezifität Zielstrukturen selektiv zu erkennen. Dabei werden solche Oberflächenmoleküle als Zielantigene gewählt, die auf den malignen Zellpopulationen überexprimiert werden. Durch die spezifisch wirkende Immuntherapie und deren geringerer Toxizität im Vergleich zu Chemotherapeutika soll der Schaden an gesundem Gewebe minimiert und die Heilungschancen des Patienten erhöht werden. Im Bereich des Antikörper-Engineerings wurden in den letzten Jahren viele innovative Ansätze verfolgt, um Tumorzellen spezifisch zu attackieren. Die Grundkonzepte der Antikörper lassen sich in zwei Gruppen einteilen: zum einen werden Antikörper benutzt, um körpereigene Effektorfunktionen zu aktivieren (Komplement, Rekrutierung von Effektorzellen) bzw. Signalkaskaden zu aktivieren oder zu inhibieren, zum anderen können sie toxische Substanzen zielgerichtet an der Tumorzelle abliefern (“Antikörper-vermitteltes *Drug-Targeting*”).

1.2.1 Therapie mit monoklonalen Antikörpern

Antikörper gehören heute zur Standardtherapie von malignen Erkrankungen. Diese sind gegen membranständige Antigene gerichtet, die zwar nicht ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden, jedoch im Vergleich zu gesundem Gewebe dort überexprimiert werden, d.h. das Expressionsmuster ist auf bestimmte Zelltypen beschränkt (Arteaga 2003). Dadurch ist es möglich eine Zellpopulation im Organismus gezielt zu attackieren und andere Gewebe dabei nicht oder nur minimal zu schädigen.

Die ersten in der Klinik eingesetzten Antikörper waren murine Antikörper. Jedoch führten diese zur Aktivierung des humanen Immunsystems und somit zur Immunisierung gegen monoklonale Antikörper. Bei der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern war es Ziel die Immunogenität zu senken sowie die Funktionalität der Antikörper zu verbessern. Durch Weiterentwicklung der molekularbiologischen Methoden können heute die immunogenen Anteile von Antikörpern stark reduziert werden. Bei chimären Antikörpern wurden die konstanten murinen Domänen durch humane ersetzt, so dass nur noch die variablen Anteile murinen Ursprungs sind. Eine weitere Reduktion der Immunogenität läßt sich durch Humanisierung erzielen. Hierbei werden die

murinen CDR (*complementary-determining regions*) in ein humanes Grundgerüst transplantiert (*CDR-Grafting*) (Morrison, Johnson et al. 1984; Newman, Alberts et al. 1992). Durch den



Einsatz von *Phage Display Technik* und transgener Tiere, die einen Teil der humanen Immunglobuline als Transgene tragen, ist die Herstellung humaner Antikörper möglich (Marks, Hoogenboom et al. 1991; Dubel,

Breitling et al. 1993; Little, Breitling et al. 1995; Lonberg and Huszar 1995; Green 1999; Kuroiwa, Kasinathan et al. 2002; Broders, Breitling et al. 2003).

Im Bereich der Hämato-Onkologie befinden sich derzeit vor allem zwei unkonjugierte Antikörper in klinischer Anwendung: Rituximab (MabThera™; Roche) und Alemtuzumab (MabCampath™, Medac Schering). Rituximab ist ein gegen das B-Zell Antigen CD20 gerichteter chimärer Antikörper und wurde 1998 in Europa für die Behandlung von B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen. CD20 ist ein Differenzierungsantigen, das auf normalen und malignen B-Lymphozyten expimiert wird.

CAMPATH-1H ist ein gegen CD52 gerichteter humanisierter Antikörper und wurde 2001 für die Behandlung von Fludarabin-refraktärer chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) zugelassen. CD52 wird vor allem auf B- und T-Lymphozyten in hoher Dichte expimiert. Neben den beschriebenen Antikörpern befinden sich weitere Antikörper zur Behandlung hämatologischer und onkologischer Erkrankungen in klinischer Erprobung bzw. sind schon zugelassen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2:
Von der FDA In der Hämatologie und Onkologie zugelassene Antikörper (FDA, Stand 2008)

Antikörper	Produktname	Format	Antigen	Indikation
Ibritumomab Tiuxetan	Zevalin™	murin	CD20	B-NHL (Radioimmuntherapie)
Tositumomab*	Bexxar™	murin	CD20	B-NHL (Radioimmuntherapie)
Rituximab	MabThera™, Rituxan™	chimär	CD20	B-NHL
Cetuximab	Erbitux™	chimär	EGFR	Metastasierendes Kolonkarzinom, SCCHN
Trastuzumab	Herceptin™	humanisiert	Her2/neu	Mammakarzinom
Gemtuzumab Ozogamicin*	Mylotarg™	Humanisiert, Calicheamicin- beladen	CD33	AML
Alemtuzumab	MabCampath™	humanisiert	CD52	B-CLL
Bevacizumab	Avastin™	humanisiert	VEGF	Kolorektales Karzinom, nicht- kleinzelliges Bronchialkarzinom
Panitumumab	Vectibix™	human	EGFR	Kolorektales Karzinom

* In Deutschland nicht zugelassen

(Quelle: IMGT)

1.2.2 Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper

Antikörper können auf unterschiedliche Weise im Organismus therapeutische Wirkung erzielen. Die vermittelten Effektormechanismen werden generell in direkte und indirekte Wirkprinzipien unterteilt. Direkte Effektormechanismen, Blockierung und Signalvermittlung durch Antikörper, werden durch die variablen Regionen der Antikörper vermittelt. Indirekte Mechanismen, die durch den konstanten Teil (Fc-Teil, *fragment crystalizable*) des Antikörpers vermittelt werden, erzielen ihre Wirkung über die Rekrutierung von Komponenten des Komplementsystems oder durch Rekrutierung von körpereigenen Immuneffektorzellen, die eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) vermitteln können (Nimmerjahn and Ravetch 2008 a; Nimmerjahn and Ravetch 2008 b).

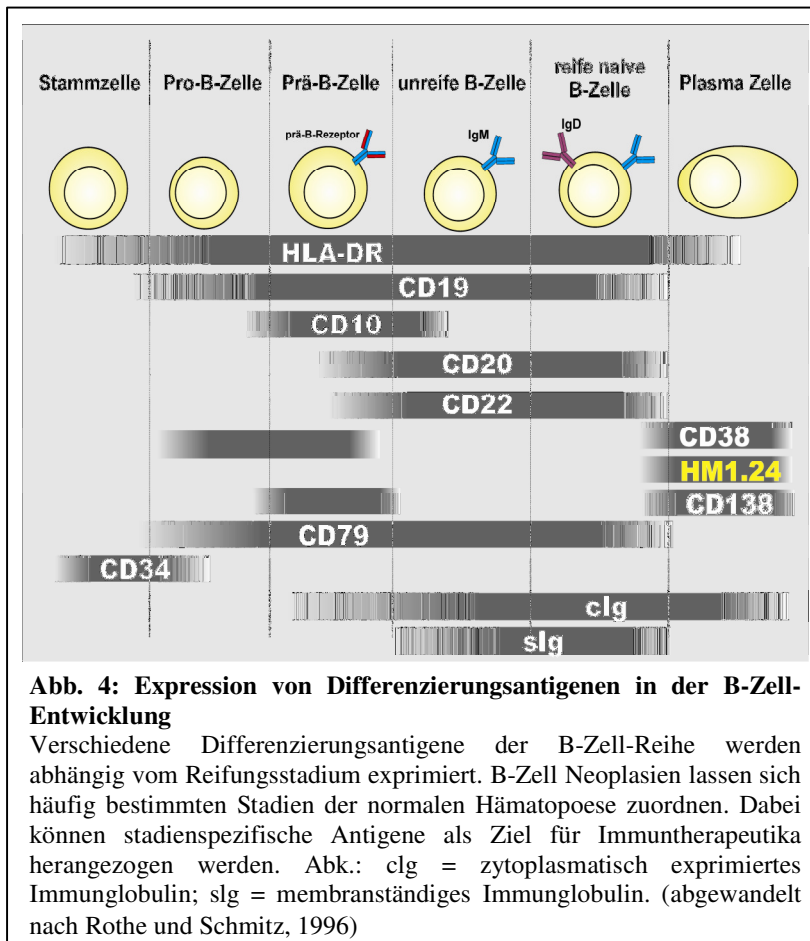
einen wichtigen Mechanismus *in vivo* darstellt, wird derzeit kontrovers diskutiert (Golay, Lazzari et al. 2001; Weng and Levy 2001).

Weitere indirekte Wirkmechanismen therapeutischer Antikörper werden über die Rekrutierung und Aktivierung von Immuneffektorzellen, wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), neutrophile Granulozyten oder Makrophagen, vermittelt. Die Aktivierung von Effektorzellen und Vermittlung von antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität erfolgt durch die Bindung der Immuneffektorzellen an Fc-Rezeptoren. Für IgG-Antikörper werden drei Fc-Rezeptoren unterschieden: der hochaffine FcγRI (CD64) und die beiden niedrig-affinen Fc-Rezeptoren, FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16), die mit der *common-γ*-Kette intrazelluläre Prozesse vermitteln. Durch Stimulation über Fc-Rezeptoren werden die Effektorzellen aktiviert und führen zu einem zytolytischen Angriff oder zur Phagozytose der gebundenen Tumorzellen. Die therapeutische Wirksamkeit ist dabei stark von der Anwesenheit aktivierender Fc-Rezeptoren abhängig, wie in Tiermodellen mit Rituximab und Herceptin gezeigt wurde (Clynes, Towers et al. 2000).

Antikörper können auch genutzt werden, um eine Immunantwort zu modulieren. Durch Bindung des Antikörpers, der dabei den natürlichen Liganden des Zielmoleküls imitiert, werden blockierende oder stimulierende Signale in T-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen (APC) ausgelöst. Dies kann zu einer Expansion von tumorreaktiven T-Zellen führen. So stimulieren Antikörper gegen das Antigen CTLA-4 auf zytotoxischen T-Lymphozyten eine T-Zell- Immunantwort durch Blockade des inhibitorischen Effektes von CTLA-4, wie in präklinischen und klinischen Studien gezeigt werden konnte (Weber 2007). Dadurch überwiegen die aktivierenden Signale über CD28, was eine Expansion zytotoxischer T-Zellen zur Folge hat, die den Tumor zerstören und für eine anhaltene Immunantwort sorgen können.

1.2.3 Zielstrukturen auf malignen Plasmazellen

Ein wichtiges Kriterium bei der Entwicklung von therapeutischen Antikörpern ist die Auswahl der Zielstruktur, gegen die sich der Antikörper richten soll. Bei der Therapie des Multiplen Myeloms spielen monoklonale Antikörper bisher keine größere Rolle, da für Myelomzellen nur wenig geeignete Zielmoleküle definiert sind. Die meisten B-Zell assoziierten Antigene, wie CD20, CD19, CD22, werden häufig nicht auf Myelomzellen exprimiert. Deswegen fallen



Antikörper wie Rituximab, der bei B-Zell-Neoplasien Einsatz findet, als Therapieoption häufig aus. Potentielle Zielmoleküle für Multiples Myelom/Myelomzellen sind CD38, CD40, CD56, CD74, CD138 und CS1 (Tai, Dillon et al. 2008). Ein CD38 Antikörper zeigte *in vitro* zytolytische Aktivität mittels ADCC und *in vivo* konnte eine Reduktion der Tumorgroße in SCID-Mäusen beobachtet werden (Peipp, de Weers et al, 2005; Stevenson 2006; Tai, Dillon et al. 2008).

Derzeit befinden sich verschiedene humanisierte Antikörper für Multiples Myelom in klinischen Studien: CD40 (SGN-40 and HCD122) (Tai, Catley et al. 2004; Tai, Li et al. 2005), CD74 (hLL1, oder Doxorubicin-conjugierte Variante) (Stein, Qu et al. 2004; Sapra, Stein et al. 2005), CD56 (konjugiert mit antimikrotubuli agent DM1) (Tassone, Gozzini et al. 2004). Der murine CD138 Antikörper konjugiert mit DM1 (B-B4-DM1) (Tassone, Goldmacher et al. 2004), anti-HLAA (2D7-DB) (Sekimoto, Ozaki et al. 2007), anti-IL-6-Rezeptor (NRI) (IL-6 als wichtiger Wachstumsfaktor für Myelomzellen, durch Blockade der Signalwege kommt es zur Wachstumsinhibition) (Yoshio-Hoshino, Adachi et al. 2007), und anti-beta2-Mikroglobulin (Yang, Qian et al. 2006), zeigen ebenfalls Antitumoraktivität in präklinischen Studien. Jedoch werden viele dieser Antigene nicht nur mit hohem Anteil auf Myelomzellen exprimiert, sondern auch auf normalen Geweben.

1.2.4 HM1.24 als Zielstrukturen auf Myelomzellen

HM1.24 (Synonym: BST-2, CD317) wurde als Plasmazell-spezifisches Oberflächenmolekül identifiziert, welches auf terminal differenzierten B-Zellen exprimiert wird und auf Myelomzellen überexprimiert ist. Auf anderen Zellen in Blut, Knochenmark, Leber, Milz, Niere oder Herz von gesunden Menschen wurde keine Expression gefunden (Goto, Kennel et al. 1994). HM1.24 ist ein Typ II transmembran Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 29-33 kDa (Ohtomo, Sugamata et al. 1999). Über die Funktion ist bisher wenig bekannt. Jüngere Untersuchungen zeigen eine HM1.24-Expression auf der Zelloberfläche von HIV-infizierten Zellen (CD4-positiven Zellen), damit wurde HM1.24 als Tetherin identifiziert, welches durch Inhibition von Vpu, ein HIV-1 assoziiertes Protein, die Abgabe von Retrovirus-Partikeln hemmt (Neil, Zang et al. 2008). Auch auf der Zelloberfläche von Lungentumorzellen konnte HM1.24 identifiziert werden. Chimäre sowie humanisierte monoklonale HM1.24 Antikörper induzierten Zelllyse von Lungentumorzellen mittels ADCC *in vitro*, wobei die Effizienz durch Zugabe von Interleukinen und Interferonen gesteigert wurde (Wang, Nishioka et al. 2008).

HM1.24 gehört zu einer neuartigen Gruppe von Membranproteinen, eine N-terminale hydrophobe Region dient als konventionelle Transmembran-Domäne und die C-terminale Domäne ist über GPI (Glycosyl-Phosphatidylinositol Kette) in der Membran verankert (Kupzig, Korolchuk et al. 2003).

In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein humanisierter monoklonale HM1.24 den Zelltod von Myelomzellen *in vivo* mittels ADCC induziert (Ono, Ohtomo et al. 1999). Die Antitumoraktivität wird vermittelt über Effektorzellen (NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen). Trotz der Erwartung der verringerten Funktion von NK-Zellen in Tumorpatienten, wurde eine gesteigerte Anzahl und erhöhte Aktivität von NK-Zellen im peripheren Blut sowie im Knochenmark von MM-Patienten beobachtet (Ozaki, Kosaka et al. 1999). Diese Zellen können demnach als Effektorzellen agieren, um die mit dem Antikörper opsonierten Zielzellen zu lysieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zytolytische Aktivität durch HM1.24 Antikörper mit dem Level der HM1.24 Expression auf der Zelloberfläche von Myelomzellen korreliert (Kawai, Koishihara et al. 2006).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass HM1.24 ein potentieller Zielantigen auf Myelomzellen darstellt und dass HM1.24 Antikörper das Potential neuer therapeutischer Strategien besitzen.

1.3 Bedeutung von Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptor vermittelte Mechanismen wie ADCC spielen eine wichtige Rolle für die Antitumoraktivität von therapeutischen Antikörpern in Tiermodellen und klinischen Studien. In Fc-Rezeptor *gamma-chain knock-out* Tieren, die keine aktivierenden Fc-Rezeptoren exprimieren, konnte gezeigt werden, dass Antikörper an Wirksamkeit verlieren (Clynes, Towers et al. 2000). So senken Interaktionen mit inhibierenden Fc-Rezeptoren, wie FcγIIb auf Mononzyten, Makrophagen, die zytotoxische Aktivität (Clynes, Towers et al. 2000). *Knock-out* von CD32b erhöht die therapeutische Wirksamkeit. Bei Antikörperisotypen, die stärkere Affinität zu aktivierenden und weniger starke Affinität zu inhibierenden Fc-Rezeptoren zeigten, konnte eine gesteigerte Antitumoraktivität in Tierexperimenten beobachtet werden (Nimmerjahn, Bruhns et al. 2005; Nimmerjahn and Ravetch 2007). Weiterhin wird die therapeutische Effizienz von monoklonalen Antikörpern durch Interaktionen der Antikörper-Fc-Domäne mit Fc-Rezeptoren auf nicht-zytotoxischen Zellen, z.b. Thrombozyten oder B-Zellen, oder nicht aktivierende Fc-Rezeptoren, wie FcγIIIb auf Granulozyten, reduziert (Peipp and Valerius 2002).

Fc-Rezeptor-Polymorphismen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für das klinische Ansprechen auf Antikörpertherapie. Für den bi-allelischen Polymorphismus von FcγIIIa (Val158 vs Phe 158) konnte gezeigt werden, dass die beiden allelischen Varianten mit unterschiedlicher Affinität an den Fc-Teil von Rituximab binden, und somit die therapeutische Effizienz beeinflusst wird (Cartron, Dacheux et al. 2002; Weng and Levy 2003).

Aufgrund der eben geschilderten Erkenntnisse kann die therapeutische Effizienz von Antikörpern möglicherweise optimiert werden, wenn die Affinität des Fc-Teils zu aktivierenden Fcγ-Rezeptoren gesteigert wird (Woof 2005).

1.4 Bispezifische Antikörper

Es gibt verschiedene Konzepte zur Verbesserung der Effektorzellrekrutierung. Zum einem können Fc-Teile durch *Glycoengineering* und durch *Proteinengineering* (Peipp et al. 2007; Shields, Namenuk et al. 2001; Shields, Lai et al. 2002; Shinkawa, Nakamura et al. 2003; Lazar, Dang et al. 2006) modifiziert werden. Beide Ansätze zeigen *in vitro* und in Tiermodellen eine

verbesserte lytische Aktivität. Eine weitere Möglichkeit bieten bispezifische Antikörper, die mit hoher Affinität an den jeweiligen aktivierenden Fc-Rezeptor binden, jedoch nicht an den inhibitorischen Fc-Rezeptor CD32b.

Bispezifische Antikörper (bsAk) sind Konstrukte, die sich durch 2 unterschiedliche Antigenbindungsstellen auszeichnen (Fanger, Segal et al. 1991). Dabei ist eine

Bindungsspezifität gegen ein Antigen auf der Oberfläche von Tumorzellen gerichtet. Die andere Antigenbindungsstelle ist gegen ein zytotoxisches Triggermolekül auf Effektorzellen des Immunsystems (T-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen,

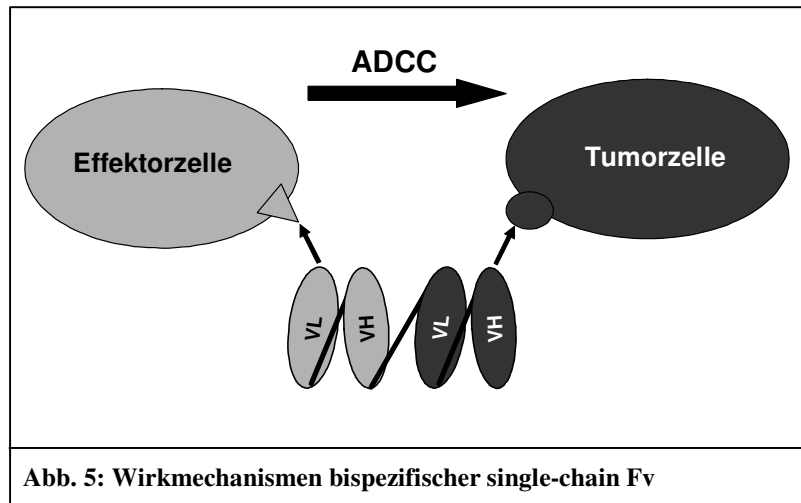


Abb. 5: Wirkmechanismen bispezifischer single-chain Fv

usw.) gerichtet. Durch die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems an die Tumorzellen, kann die Effektorzell-vermittelte Lyse der malignen Zellen induziert werden (Segal, Weiner et al. 1999). Je nach Auswahl der zytotoxischen Triggermoleküle lassen sich gezielt einzelne Effektorzellpopulationen zur Tumorzelllyse rekrutieren.

1.4.1 Zielstrukturen auf Effektorzellen

Bei der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität werden Effektorzellen des Immunsystems Antikörper-abhängig in räumliche Nähe von Tumorzellen gebracht. Über die Bindung der Antikörper an die Oberflächenantigene von zytotoxischen Zellen werden diese aktiviert und induzieren die Tumorzelllyse. Zytotoxische Triggermoleküle sind im Immunsystem auf verschiedenen Zellpopulationen vorhanden. Für die Rekrutierung von NK-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten stellen Fc-Rezeptoren interessante Triggermoleküle dar. NK-Zellen (und Makrophagen) können über den niedrig affinen CD16-Rezeptor (FcγRIIIa) aktiviert werden. Über den hoch affinen CD64-Rezeptor (FcγRI) können Monozyten und Makrophagen rekrutiert werden. Nach Bindung des Antikörpers an den CD64-Rezeptor kommt

es zur Phagozytose der mit Antikörpern opsonierten Zelle (Ravetch and Kinet 1991). Unter Stimulation mit IFN- γ und G-CSF wird CD64 auch auf aktivierenden Granulozyten, v.a. Neutrophilen, exprimiert, die somit auch potente Effektorzellen für CD64-Antikörper unter G-CSF Therapie darstellen (Repp, Valerius et al. 1991). In verschiedenen Studien erwiesen sich CD16 und CD64 als potente Zielstrukturen bei der Vermittlung zellulärer Zytotoxizität gegenüber malignen Zellen (Renner and Pfreundschuh 1995; Curnow 1997; Deo, Graziano et al. 1997). Die Aktivierung von Granulozyten erfolgt über den myeloischen IgA-Rezeptor, CD89 (Fc α RI), und führt ebenfalls zur effektiven Lyse von Tumorzellen (Valerius, Stockmeyer et al. 1997; Stockmeyer, Dechant et al. 2000; Dechant, Vidarsson et al. 2002). CD89 wird auch von Monozyten/Makrophagen und Subgruppen dendritischer Zellen exprimiert (Repp, Valerius et al. 2001). T-Zellen, die aufgrund ihrer fehlenden Fc-Rezeptorexpression

Tabelle 3:
Fc-tragende Effektorzellen und ihre Triggermoleküle

Effektorzellen	Triggermoleküle
NK-Zellen	Fc γ RIIIa (CD16)
Monozyten/Makrophagen	Fc γ RI (CD64)
	Fc γ RIIIa (CD16)
	Fc α RI (CD89)
Granulozyten	Fc γ RI (CD64)
	Fc α RI (CD89)

(Peipp und Valerius, 2002)

als direkte Effektorzellen für Antikörpertherapien bisher nicht geeignet waren, können durch bispezifische Antikörper aktiviert werden. Zytotoxische T-Zellen lassen sich über den T-Zell-Rezeptor (TCR)/CD3-Komplex rekrutieren. Allerdings benötigen T-Zellen zur Aktivierung häufig ein zweites aktivierendes Signal (Segal, Weiner et al. 1999).

Derzeit befindet sich ein bispezifischer scFv (*single-chain Fragment variable*), gerichtet gegen CD19 und CD3 (Blinatumomab), für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen in klinischen Studien. Es konnte gezeigt werden, dass dieser zur Tumorregression führt und dabei eine höhere Potenz aufweist als ein konventioneller monoklonaler Antikörper gegen CD19 (Bargou, Leo et al. 2008).

Für die Therapie mit bispezifischen Antikörpern stellen NK-Zellen eine interessante Effektorzellpopulation dar, da ihr zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen in vielen Studien hinreichend untersucht und bewiesen wurde. CD16 ist der niedrig affine Rezeptor für

IgG (Fc γ RIII) mit einem Molekulargewicht von 50-80 kDa (Ravetch and Perussia 1989). CD16 wird exprimiert als Transmembran-Isoform auf der Oberfläche von NK-Zellen und Makrophagen (CD16a) und als Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankertes Molekül auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten (CD16b) (Simmons and Seed 1988). Der extrazelluläre Anteil von CD16 besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, wobei der Unterschied zwischen beiden Isoformen in nur sechs Aminosäuren liegt (Ravetch and Perussia 1989). Nach Aktivierung kommt es bei NK-Zellen zur Ausschüttung der Inhaltstoffe ihrer lytischen Granulae, welche zur Lyse der Tumorzellen führen (Daeron 1997). CD16b, die GPI-verankerte Isoform auf Neutrophilen (Ravetch and Kinet 1991; van de Winkel and Anderson 1991), kann dagegen keine zelluläre Zytotoxizität vermitteln. Studien mit konventionellen CD16-gerichteten bispezifischen Antikörpern zur Rekrutierung von NK-Zellen zeigten eine effiziente Lyse von malignen Zellen *in vitro* und in Tiermodellen (Garcia de Palazzo, Holmes et al. 1992; Hombach, Jung et al. 1993; Kipriyanov, Cochlovius et al. 2002) sowie in klinischen Studien (Deo, Graziano et al. 1997).

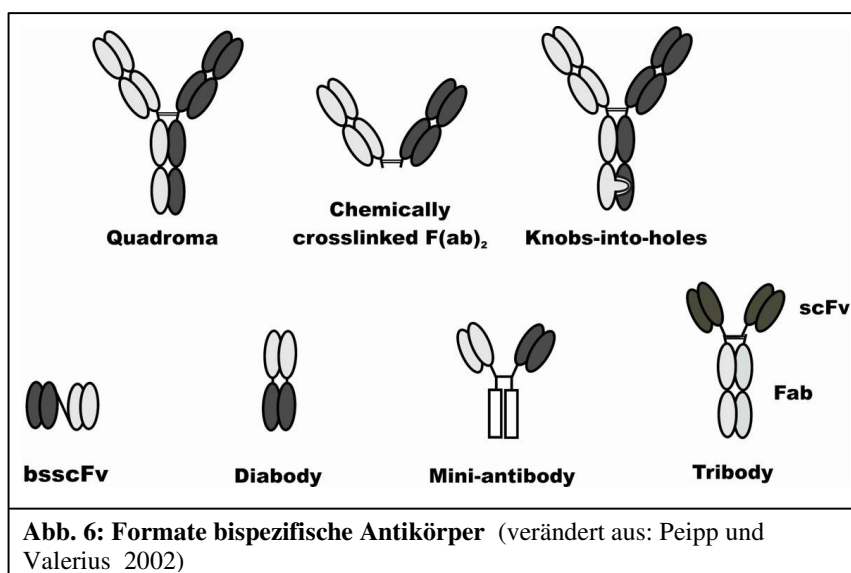
Bispezifische Antikörper sind in der Lage, aktivierende Fc-Rezeptoren, wie CD16, selektiv anzusteuern, im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern, die über ihren Fc-Teil an unterschiedliche Fc-Rezeptoren binden (Daeron 1997) (Fanger and Erbe 1992; Deo, Graziano et al. 1997). Die Wechselwirkung mit nicht-aktivierenden oder inhibierenden Fc-Rezeptoren wird somit unterbunden und die therapeutische Effektivität nicht reduziert. Durch die geringere Größe bispezifischer Antikörper ist anzunehmen, dass die Penetration ins Tumorgewebe erhöht ist, wodurch die therapeutische Effizienz bei soliden Tumoren gesteigert werden könnte. Bei der Anwendung von bispezifischer Antikörper wurde außerdem beobachtet, dass sie weniger Oberflächenantigene auf Tumorzellen benötigen als konventionelle Antikörper sowie eine geringere Konzentration, um Wirkung zu erzielen (Peipp and Valerius 2002).

1.4.2 Herstellung bispezifischer Antikörper

Bispezifische Antikörper können nach verschiedenen Methoden hergestellt werden. Die erste Generation bispezifischer Antikörper entstand durch die Fusion zweier Hybridom-Zelllinien, sogenannte Quadroma (Milstein and Cuello 1983). Nach Selektion der Moleküle, die jeweils die passende Schwer- und Leichtkettenkombination aufweisen, können bispezifische

Hybridmoleküle gewonnen werden (Repp, Valerius et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Kopplung der F(ab')-Fragmente (*fragment antigen binding*) von zwei verschiedenen Antikörpern, so dass [F(ab)xF(ab)]-bsAk entstehen (Karpovsky, Titus et al. 1984; Glennie, McBride et al. 1987). Das zytotoxische Potential dieser bispezifischen Antikörper konnte *in vitro* und in Tiermodellen gezeigt werden (Brissinck, Demanet et al. 1991; Weiner and Hillstrom 1991; Renner, Jung et al. 1994). Auch in nachfolgenden klinischen Studien konnte klinisches Ansprechen bei einzelnen Patienten beobachtet werden (Canevari, Mezzanzanica et al. 1995; Lamers, Bolhuis et al. 1997; Segal, Weiner et al. 1999; Repp, van Ojik et al. 2003), dennoch traten spezifische Probleme auf. Die murinen Anteile der Antikörper lösten bei den meisten Patienten Immunreaktionen aus, die zu einer Bildung von humanen anti-Maus Antikörpern (*human anti-mouse antibody*, HAMA) führten, und die Wirkung somit neutralisierten (Weiner, Clark et al. 1995; Hartmann, Renner et al. 1997). Weiterhin kam es durch Kreuzvernetzung zwischen den Fc-Domänen der Quadroma Antikörper und den Fc-Rezeptoren auf zytolytischen Zellen zu einer massiven Zytokinfreisetzung, die zusätzlich Toxizitäten im Patienten hervorrief (Weiner, Clark et al. 1995; Link, Kostelny et al. 1998). Letztendlich erfordern beide Antikörperformate aufwendige und kostenspielige Produktions- und Aufreinigungsverfahren, was den Einsatz in der Klinik limitierte (Hartmann, Renner et al. 1997).

Aus diesen Gründen war es notwendig, neue Konstrukte bispezifischer Antikörper zu entwickeln, wie solche die keinen Fc-Teil besitzen oder die humane Antikörper als Ausgangsmaterial verwenden, sowie effizientere Expressionssysteme zur



Herstellung dieser Konstrukte. Der molekularbiologische Fortschritt ermöglichte die Herstellung von rekombinanten bispezifischen Antikörper wie single-chain Fv bispezifischen Antikörpern

oder Diabodies (2. Generation bsAk). Ein scFv (*single-chain Fragment variable*), die kleinste antigenbindende Einheit eines Antikörpers, besteht aus den variablen Regionen der leichten Kette (VL) und den variablen Regionen der schweren Kette (VH), die über eine Polypeptidkette miteinander verbunden sind. Bispezifische scFv Antikörper (bsscFv) (Tandem Format) bestehen aus zwei scFv-Fragmenten, die über einen flexiblen Polypeptidlinker kovalent miteinander verknüpft sind (Mack, Riethmuller et al. 1995). BsscFv haben ein Molekulargewicht von 55-60 kDa und besitzen beide Bindungsspezifitäten auf einer Polypeptidkette. Diabodies sind nicht kovalent verbundene Dimere, wobei jede Kette aus zwei Domänen besteht, die aus der VL- und der VH zweier unterschiedlicher Antikörpern zusammengesetzt sind (Holliger, Prospero et al. 1993). Die Koexpression beider Ketten führt zur Bildung eines heterodimeren bispezifischen Antikörpers. Durch das geringe Molekulargewicht von Diabodies, etwa 50 kDa, wird eine rasche Pharmakokinetik und eine verbesserte Tumorpenetration *in vivo* erwartet, jedoch zeigten Untersuchungen eine zu kurze Retentionszeit im Tumor (Wu, Chen et al. 1996). Dennoch bieten Diabodies vielversprechende Ergebnisse *in vitro* und in Tiermodellen. In Xenograft Non-Hodgkin-Lymphomen konnte durch Gabe von CD16xCD30 bispezifischen Diabodies eine NK-Zell-vermittelte Regression beobachtet werden (Arndt, Krauss et al. 1999). Eine weitere Entwicklung ist die Herstellung von kompletten bispezifischen IgG Molekülen. Hierbei wird eine Heterodimerisierung nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip durch den Austausch von Aminosäuren in den konstanten Teilen der schweren Kette erzwungen, sogenanntes *knobs-into-holes* (Carter 2001). Mini-Antibodies können durch Fusion zweier unterschiedlicher scFv an Dimerisierungsdomänen, wie zum Beispiel die CH1-Domäne, erzeugt werden (Muller, Arndt et al. 1998).

1.5 Rationale und Ziele der Arbeit

Seit einigen Jahren findet eine Reihe Antikörper-basierter Immuntherapeutika ihren klinischen Einsatz für die Behandlung von Leukämien und Lymphomen. Durch ihre hohe Antigenspezifität sind therapeutische Antikörper in der Lage, Zielstrukturen selektiv zu erkennen und somit MRD-Zellen zu eliminieren. Fc-Rezeptor vermittelte Mechanismen wie ADCC spielen eine wichtige Rolle für die Antitumoraktivität. Durch gezielte Rekrutierung von Effektorzellen, wie durch Verwendung bispezifischer Antikörper, kann die therapeutische Effizienz von Antikörpern

gesteigert werden. So lassen sich je nach Auswahl der zytotoxischen Triggermoleküle gezielt einzelne Effektorzellpopulationen zur Tumorzelllyse rekrutieren. Bei der Therapie des Multiplen Myeloms spielten Antikörper bisher keine größere Rolle, da nur wenig geeignete Zielmoleküle auf Myelomzellen definiert wurden. Viele der sich derzeit in präklinischen und klinischen Studien befindlichen Antikörper gegen Myelomzellen, richten sich auch gegen Antigene auf normalen Geweben. HM1.24 wurde als Antigen definiert, welches auf terminal differenzierten B-Zellen exprimiert und auf Myelomzellen überexprimiert wird. In präklinischen Studien mit einem humanisierten Antikörper gegen HM1.24 konnte der Zelltod von Myelomzellen mittels ADCC vermittelt werden, wobei die Antitumoraktivität über die Rekrutierung von Effektorzellen erfolgt. Die Rekrutierung von NK-Zellen über FcγRIIIa (CD16) zeigt ein hohes zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen, wie in vielen Studien bewiesen wurde. Ebenfalls wurde eine gesteigerte Anzahl und erhöhte Aktivität von NK-Zellen im peripheren Blut und Knochenmark von Tumorpatienten beobachtet (Ozaki, Kosaka et al. 1999). Somit stellen NK-Zellen eine geeignete Effektorzellpopulation zur Induktion der Tumorzelllyse dar.

Das zentrale Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung, Herstellung und funktionelle Charakterisierung eines bispezifischen Antikörpers zur Behandlung des Multiplen Myeloms, da für Patienten mit derartigen Erkrankungen die Prognose auch heute noch sehr schlecht ist. Dieser bispezifische Antikörper sollte, sowohl an ein Tumorantigen, als auch an ein aktivierendes Molekül auf der Oberfläche von Effektorzellen binden, um auf diese Weise eine Effektorzellrekrutierung und Lyse Antigen-positiver Zellen zu vermitteln.

Daher sollten in dieser Arbeit als spezifisches Ziel, die Entwicklung eines HM1.24- und CD16-gerichteten bispezifischen single-chain Fv zur effektorzellvermittelten Lyse maligner Myelomzellen, verfolgt werden. Ausgehend von spezifisch bindenden scFv-Fragmenten gegen HM1.24 und CD16 sollte der bispezifische single-chain Fv [HM1.24xCD16] konstruiert werden. Nach Expression und zweistufiger affinitätschromatographischer Aufreinigung des bsscFv sollte die spezifische Bindung an seine Zielantigene, HM1.24 und CD16, mittels Immunfluoreszenzanalysen auf Antigen-positiven Zellen nachgewiesen werden. Anschließend sollte der bsscFv an seine Fähigkeit zur NK-Zell-Rekrutierung und Vermittlung zellulärer Zytotoxizität in Zellkulturstudien an Zelllinien und primären Tumormaterial untersucht werden und die Effektivität des bispezifischen Antikörpers mit der des monoklonalen Antikörpers gegen HM1.24 verglichen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wie Salze, Puffersubstanzen, Lösungsmittel, Antibiotika etc. wurden von den Firmen Qiagen (Hilden), Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), PAA Laboratories (Pasching), Biochrom (Berlin), GE Healthcare (München), Merck (Darmstadt), Pierce (Rockford, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Dianova (Hamburg), Biotest (Dreieich) bezogen.

Für die Herstellung von Lösungen und Verdünnungen wurde ausschließlich Wasser aus der Deionisationsanlage MilliQ der Firma Millipore (Eschborn) mit einem spezifischen Widerstand von $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ verwendet.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Wo nicht anders beschrieben, sind Puffer und Lösungen bekannten Protokollsammlungen entnommen (Sambrook and Russell 2001).

SDS-Page

SDS-Page – Trenngel	Acrylamid	2,668 ml
	Tris (1,5M; pH 8,8)	2,001 ml
	SDS (10%)	80 μl
	a.d.	3,252 ml
	APS (10%)	60 μl
	TEMED	6 μl

SDS-Page – Sammelgel	Acrylamid	0,667 ml
	Tris (0,5M, pH 6,8)	1 ml
	SDS (10%)	40 µl
	a.d.	2,293 ml
	APS (10%)	20 µl
	TEMED	4 µl

Laufpuffer SDS-Page	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS (0,1% w/v, pH 8,3)	0,1%

Coomassie

Coomassie-Färbelösung	H ₂ O	60 ml
	Methanol	20 ml
	Roti-Blue	20 ml

Waschlösung	MeOH 99,8%	25 ml
	H ₂ O	75 ml

Westernblot

Westernblot Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol (30% v/v, pH 8,3)	30%

TBS Puffer (Blocken)	Tris-Cl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	150 mM

TBS-Tween/Triton Puffer (Waschen)	Tris-Cl, pH 7,5	20 mM
	NaCl	500 mM
	Tween 20 (v/v)	0,05 %
	Triton X-100 (v/v)	0,2 %

Puffer für Proteinaufreinigung über Hexa-Histidin-Tag

Waschpuffer	NaCl	300mM
	Na-Phosphat	50 mM
	Imidazol, pH 7,4	10 mM
Elutionspuffer	NaCl	300 mM
	Na-Phosphat	50 mM
	Imidazol, pH 7,4	500 mM

Puffer für Proteinaufreinigung über StrepII-Tag

nach Hersteller-Anleitung (Qiagen, Hilden)

Zytokine

GM-CSF (R&D Systems, Wiesbaden)

IL-6 (Biosource, USA)

2.1.3 Vektoren

pSEC Tag Hygro C	→	Säuger Expression (Invitrogen, Karlsruhe)
pAK 400	→	E.coli (scFv Expression) (Krebber, Bornhauser et al. 1997)

2.1.4 Bakterienstämme

E.coli XL1-Blue	→	Klonierung (Stratagene, Kanada)
E.coli HB2151	→	Expression der scFv (Krebber, Bornhauser et al. 1997)

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Referenz
293T	Humane Nierenfibroblasten stabil transfiziert mit SV40 large T-Antigen	(Pear et al. 1993)
ARH-77	EBV-positive lymphoblastoide B-Zelllinie	(Drewinko, Mars et al. 1984)
BHK	Baby hamster kidney Zellen	(Capstick 1963)
CHO	Chinese hamster ovary Zellen	(Puck 1958)
INA-6	Humane Plasmazellleukämie-Zelllinie, IL-6 abhängig	(Burger, Guenther et al. 2001)
JK6L	Humane Myelomzelllinie	(Meister, Schubert et al. 2007)
L363	Humane Plasmazellleukämie-Zelllinie	(Diehl, Schaadt et al. 1978)
MM1.S	Humane Myelomzelllinie	(Greenstein, Krett et al. 2003)
Raji	Humane Burkitt-Lymphom Zelllinie	(Pulvertaft 1964)
RPMI 8226	Humane Myelomzelllinie	(Matsuoka, Moore et al. 1967)
U266	Humane Myelomzelllinie	(Nilsson, Bennich et al. 1970)

2.1.6 Zellkulturmedien

Zelllinie:

293T

ARH-77, CHO-CD16, CHO-CD89, JK6L, L363, MM1.S, Raji, RPMI 8226, U266

INA-6

Medium:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4mM L-Glutamin

10% fetales Kälberserum

1% Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640 mit Glutamax

10% fetales Kälberserum

1% Penicillin/Streptomycin

RPMI 1640 mit Glutamax

10% fetales Kälberserum

1% Penicillin/Streptomycin

2,5ng/ml IL-6

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Klonalität	Referenz
Cetuximab (Erbix TM) (chimärisiert, VEGF), IgG1	monoklonal	Merck
F3.3 (Maus-HLA II), IgG1	monoklonal	(Elsasser, Valerius et al. 1996)
3G8 (Maus-CD16), IgG1	monoklonal	(Fleit, Wright et al. 1982)
HM1.24 (humanisiert), IgG1	monoklonal	(Ozaki, Kosaka et al. 1999)
scFv-CD16	scFv	(Bruenke, Fischer et al. 2004)
scFv-CD89	scFv	Wachter, unpublizierte Daten
scFv-HM1.24	scFv	Peipp, unpublizierte Daten
TH-69 (Maus-CD89), IgG1	monoklonal	(Baum, Steininger et al. 1996)
Maus-anti-Pentahistidin	monoklonal	Qiagen
Anti-his-tag Alexa Fluor 488	monoklonal	Qiagen
Schaf-anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt	polyklonal	Dianova
Anti-human-Fc-FITC	polyklonal	Sigma-Aldrich
IgG-FITC (H2)	monoklonal	Beckmann&Coulter
IgG-PE (H2)	monoklonal	Beckmann&Coulter
IgG-ECD (H2)	monoklonal	Beckmann&Coulter
IgG-PC5 (H2)	monoklonal	Beckmann&Coulter
CD56-PE (N901)	monoklonal	Beckmann&Coulter
CD4-PE (13B8.2)	monoklonal	Beckmann&Coulter
CD11c-PE (BU15)	monoklonal	Beckmann&Coulter
CD45-ECD (J.33)	monoklonal	Beckmann&Coulter
CD19-PC5 (J3-119)	monoklonal	Beckmann&Coulter
CD8-PC5 (B9.11)	monoklonal	Beckmann&Coulter
CD33-PC5 (D3HL60.251)	monoklonal	Beckmann&Coulter

2.2 Methoden

2.2.1 Expression des HM1.24-gfp+, HM1.24-Fc, bsscFv in Säugetierzellen

Für die Expression des bsscFv HM1.24xCD16 wurden 293T-Zellen verwendet. 293T-Zellen werden in DMEM-Glutamax-I Medium mit 10% fetalem Kälber-Serum (FCS) und 1% Penicillin und Streptomycin kultiviert. Pro Transfektionsansatz wurden 5×10^6 Zellen auf einer Zellkulturschale ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Tag der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 20µg DNA in 875µl sterilem Wasser aufgenommen und mit 100µl CaCl₂ (2,5M) und 5µl Chloroquin (100mM) gemischt. Das DNA-Kalzium-Chloroquin-Gemisch wurde pro 1ml 1:1 vorsichtig und langsam in 1ml 2xHBS-Puffer getropft. Dabei wurde gleichzeitig mit einer zweiten Pipette Luft in den Ansatz geblasen. Anschließend wurde jeweils 2ml DNA-Gemisch gleichmäßig auf die Zellen verteilt und 8 bis 10 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach 10 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgenommen, verworfen und durch neues Medium ersetzt. Es erfolgte täglich ein Mediumwechsel, wobei die Überstände täglich über fünf Tage gesammelt wurden.

2.2.2 Aufreinigung des HM1.24-gfp+, HM1.24-Fc, bsscFv

Zum Entfernen von zellulären Debris wurde der Zellkulturüberstand für 30 Minuten bei 7500rpm abzentrifugiert. Im Anschluß wurde der Überstand steril gefiltert und mit einer Membran mit Molekulargewichtssieb von 30kDa (PAA Laboratories, Pasching) ankonzentriert. Die Reinigung des 6xHis-tragenden bsscFv erfolgte affinitätschromatographisch. Zu diesem Zweck wurde eine His-Trap-Affinitäts Säule (GE Healthcare, München) mit dem ankonzentrierten Protein-Gemisch mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5ml/min beladen. Anschließend wurde mit 20-Säulen-Volumen gewaschen. Die Elution des Antikörpers von der Säule mit Elutionspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min. Der Antikörper wurde in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen. Im Anschluß erfolgte die Aufreinigung des bsscFv über den StrepII-Tag. Die Elutionsfraktionen, in denen sich nach der Aufreinigung über den Hexa-Histidin-Tag das gewünschte Protein nachweisen ließ (mittels Coomassie-Färbung, Western-Transfer), wurden vereinigt und nach

Hersteller-Angaben (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Elutionsfraktionen, die das über StrepII-Tag gereinigte Protein enthielten, wurden vereinigt und für weitere Untersuchungen eingesetzt.

2.2.3 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen wurden 12% SDS-Page-Gele verwendet mit einer Dicke von 0,75mm. Die Herstellung der Trenn- und Sammelgele, sowie die Beladung dieser Gele mit entsprechenden aufzutrennenden Proteinen erfolgte nach Standardprotokollen (Laemmli 1970). Die aufzutragenden Proben wurden mit 4xProbenpuffer gemischt und fünf Minuten bei 94°C aufgeköcht. Anschließend kühlten die Proben auf Eis ab und wurden auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte die ersten 10 Minuten bei 120V, die nächsten 50 Minuten bei 150V.

2.2.3.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach der erfolgten Gelelektrophorese wurde das Gel mit colloidalem *Coomassie Brilliant Blue* (Roth, Karlsruhe) über mehrere Stunden bei Raumtemperatur gefärbt (auf Horizontalschüttler). Anschließend wurde das Gel im Wasser entfärbt und die gefärbten Proteinbanden wurden sichtbar.

2.2.3.2 Western Transfer

Nachdem die zu untersuchenden Proteine durch Gelelektrophorese in einzelne Proteinbanden aufgetrennt waren, wurden diese auf eine Trägermembran (PVDF-(Polyvinylidendifluorid)Membran) übertragen durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry Blotkammer für 60 Minuten bei $1\text{mA}/\text{cm}^2$. Anschließend wurde die Membran mit TBS/3% BSA über 60 Minuten blockiert (auf dem Horizontalschüttler). Nach dem Blockieren wurde der 1. Antikörper (anti-his-tag) in einer Verdünnung von 1:1000 in eine TBS/3%BSA-Lösung zugegeben und über 1 Stunde inkubiert. Im Anschluß, nachdem die Membran 3 mal für jeweils 10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen wurde, wurde der Sekundärantikörper (anti-mouse-HRP) in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS/10% Magermilchpulver zugegeben und über eine

Stunde inkubiert. Nach erneutem 3maligen Waschen der Membran in TBS-Tween erfolgte der Nachweis mittels ECL-Reagenz (enhanced chemoluminescence) von Pierce. Anschließend wurde ein digitales Foto der Membran im Biorad System aufgenommen.

2.2.4 Durchflußzytometrie

Pro Ansatz wurden 3×10^5 Zellen eingesetzt und in PBS, das 1% BSA enthält, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 50µl (mit der jeweiligen entsprechenden Konzentration) aufgereinigten Antikörper (bsscFv oder scFv) aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als Kontrollen dienten nicht-relevante Antikörper, wie scFv CD89. Die Zellen wurden 2mal in PBS/1%BSA gewaschen. Zum Nachweis der spezifischen Bindung des bsscFv oder der scFv-Fragmente wurden die Zellen mit 20µl anti-His-Tag Antikörper in einer 1:20 Verdünnung für 30 Minuten auf Eis bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS/1%BSA gewaschen und in 500µl 1%igen Paraformaldehyd in PBS fixiert.

Zum Nachweis der Oberflächenexpression von HM1.24 auf Myelomzellen wurden 3×10^5 Zellen in PBS/1%BSA gewaschen in 50µl humanisierten HM1.24-IgG1 aufgenommen und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle diente ein nicht relevanter Antikörper, Cetuximab. Nach 2maligem Waschen in PBS/1%BSA wurden die Zellen in 20µl Anti-human-Fc-FITC Antikörper (Sigma, Deisenhofen) in einer 1:50 Verdünnung aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS/1%BSA gewaschen und in 500µl PBS/1%Paraformaldehyd fixiert und im Durchflußzytometer gemessen.

2.2.5 Vollblut-Analysen mittels Durchflußzytometrie

Pro Ansatz wurden 100µl Vollblut mit 10µl polyklonalem Immunglobulin (Biotest, Dreieich) in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt. Anschließend wurden die entsprechenden Antikörper (HM1.24-FITC, Cetuximab-FITC je 10 µl bei 50µg/ml) dazugegeben und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS/1%BSA wurden pro Ansatz 1ml *Lysing Solution* zugegeben und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Durchflußzytometer

(Beckmann&Coulter). Das Gate für die Isotypen-Kontrolle wurde so gelegt, dass 0,5 bis 1% innerhalb liegen und somit Messwerte bis 1% der Events als irrelevant angesehen werden kann.

2.2.6 Zytotoxizitätsexperimente

2.2.6.1 Isolation von Effektorzellen aus Vollblut

Pro Ansatz wurden 9ml Citratblut eines gesunden Spenders über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten, bestehend aus 70%igem und 62%igem Percoll (Biochrom, Berlin), geschichtet entsprechend bekanntem Protokoll (Elsasser et al, 1996). Nach Zentrifugation wurden mononukleäre und polymorphnukleäre Zellen und Plasma aus den entsprechenden Phasen isoliert. Die gesammelten Zellen wurden mit PBS gewaschen und 5 Minuten abzentrifugiert. Noch enthaltene Erythrozyten wurden durch Zugabe von kaltem destillierten Wasser lysiert (hypotone Lyse). Anschließend wurden die Zellen in 5ml R10 Medium aufgenommen und nach Zählen auf 8×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

2.2.6.2 Isolation von Tumorzellen aus Vollblut von Tumorpatienten

Für Isolation von Tumorzellen wurden 9ml Citratblut eines Tumorpatienten über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten, wie oben beschrieben, geschichtet und anschließend zentrifugiert. Die mononukleären Zellen wurden isoliert und ihr Tumorzellanteil über CD38- und CD138-Positivität in Immunfluoreszenzanalysen gemessen. Da der Tumorzellanteil über 95% betrug, wurde auf eine Aufreinigung über CD138 verzichtet.

2.2.6.3 ADCC-Reaktionen

ADCC-Experimente wurden nach publizierten Protokollen durchgeführt (Elsasser et al, 1996). Zielzellen wurden auf eine Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt und durch Zugabe von 100 bis 200 μ l ^{51}Cr (=100 bis 200 μ Ci) (GE Healthcare, München) radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C für 3 Stunden inkubiert. Nach 3 maligem Waschen mit Medium wurden die Zielzellen auf eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen pro ml eingestellt.

Effektorzellen wurden, wie oben beschrieben, isoliert und auf eine Zellzahl von 8×10^6 Zellen pro ml eingestellt.

Für ADCC-Reaktionen wurden Mikrotiterplatten mit 96 Bohrungen (Sarstedt) verwendet. Für jeden Ansatz wurde Effektorzellen /Plasma (50µl), Zielzellen (50µl) und Antikörper pipettiert und das Volumen pro Bohrung mit RPMI-Medium auf 200µl eingestellt. Pro Ansatz wurden Triplets pipettiert. Effektorzellen und Zielzellen wurden in einem Effektor-zu-Zielzell Verhältnis von 80:1 eingesetzt, wenn nicht anders angegeben. Zur Ermittlung der Abhängigkeit des E:T-Verhältnisses wurden die Effektorzellen in 1:2-Schritten verdünnt und betrug ein E:T Verhältnis von 80:1 bis 2,5:1. Die Endkonzentrationen der Antikörper betrug in den entsprechenden Bohrungen für monoklonale Antikörper 4µg/ml bis 0,002µg/ml und für bispezifische Antikörper 2µg/ml bis 0,001µg/ml, wobei die Abnahme der Konzentrationen in 1:4 und 1:2 Schritten erfolgte. Zur Bestimmung der maximalen ^{51}Cr -Freisetzung (*Maximal Release*, MR) wurde Perchlorsäure in einer Endkonzentration von 1% zu den Zielzellen alleine zugegeben (50µl Zielzellen, 50µl Medium und 100µl Perchlorsäure (*TritonX*)). Die basale Freisetzung von ^{51}Cr (*Basal-Release*, BR) wurde in Abwesenheit von Antikörper und Effektorzellen bestimmt (150µl Medium und 50µl Zielzellen).

Die Ansätze wurden für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zentrifugieren gestoppt und 25µl Überstand pro Ansatz wurden auf Reader-Platten (Perkin-Elmer, Waltham (USA)) übertragen. Nach Zugabe von 150µl Szintillations-Mix (Super-Mix, Perkin-Elmer) pro Ansatz erfolgte die Messung der ^{51}Cr -Freisetzung der Triplikate in *counts per minute* (cpm) im beta-Counter (mikro-beta-counter, Perkin-Elmer). Die spezifische Lyse wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{experimentelle cpm} - \text{basale cpm}}{\text{maximale cpm} - \text{basale cpm}} \times 100$$

2.2.6.4 Statistische Analyse

Die Daten sind gezeigt als Mittelwerte +/- SEM (standard error of mean). Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mit ungepaarten, oder wenn möglich gepaarten Student t-Tests berechnet.

3 ERGEBNISSE

Die Effektorzell-vermittelte Lyse über HM1.24 kann durch Verwendung eines bispezifischen Antikörpers möglicherweise erhöht werden. Auf Grundlage der Ergebnisse mit humanisierten monoklonalen HM1.24 sowie den geschilderten Erkenntnissen über Fc-Rezeptoren wurde ein bispezifischer Antikörper, HM1.24xCD16, entwickelt, der die gezielte Rekrutierung von CD16-positiven Effektorzellen ermöglicht. Dieser ist durch seine beiden Antigenbindungsstellen in der Lage, HM1.24-positive Myelomzellen und CD16-positive Effektorzellen in räumliche Nähe zu bringen, und über die Aktivierung von diesen Effektorzellen, v.a. Natürlichen Killerzellen, eine zytotoxische Immunantwort mittels ADCC zu induzieren.

3.1 Untersuchung hämatopoetischer Zellpopulationen auf ihre Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche mit direkt markierten HM1.24-FITC

Da in der Literatur kontrovers die Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche von normalem Gewebe und auf Blutzellen diskutiert wird (Goto, Kennel et al. 1994; Ozaki, Kosaka et al. 1999; Kupzig, Korolchuk et al. 2003), wurden Immunfluoreszenzanalysen mit Vollblut durchgeführt, um eine Expression von HM1.24 auf Zellen des hämatopoetischen Systems zu untersuchen.

3.1.1 Herstellung eines direkt markierten HM1.24 mit FITC und Nachweis der spezifischen Bindung

Zu diesem Zweck wurde zunächst ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC direkt markierter HM1.24 Antikörper hergestellt. Anschließend wurde die Fähigkeit des HM1.24-FITC überprüft, an HM1.24-positive Zellen, INA-6, zu binden und an Antigen-negativen Zellen. In der Durchflußzytometrie konnte gezeigt werden, dass der HM1.24-FITC auf Antigen-positiven Zellen bindet und seine Bindungsfähigkeit somit erhalten ist. Ein direkt markierter Kontroll-IgG1-Antikörper, Cetuximab-FITC, diente als Kontrolle.

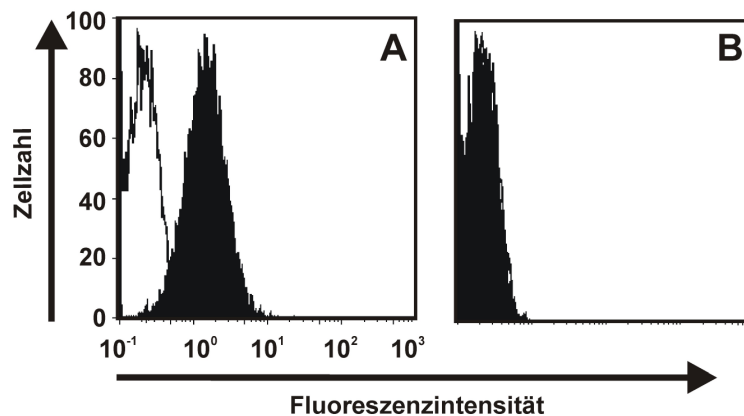


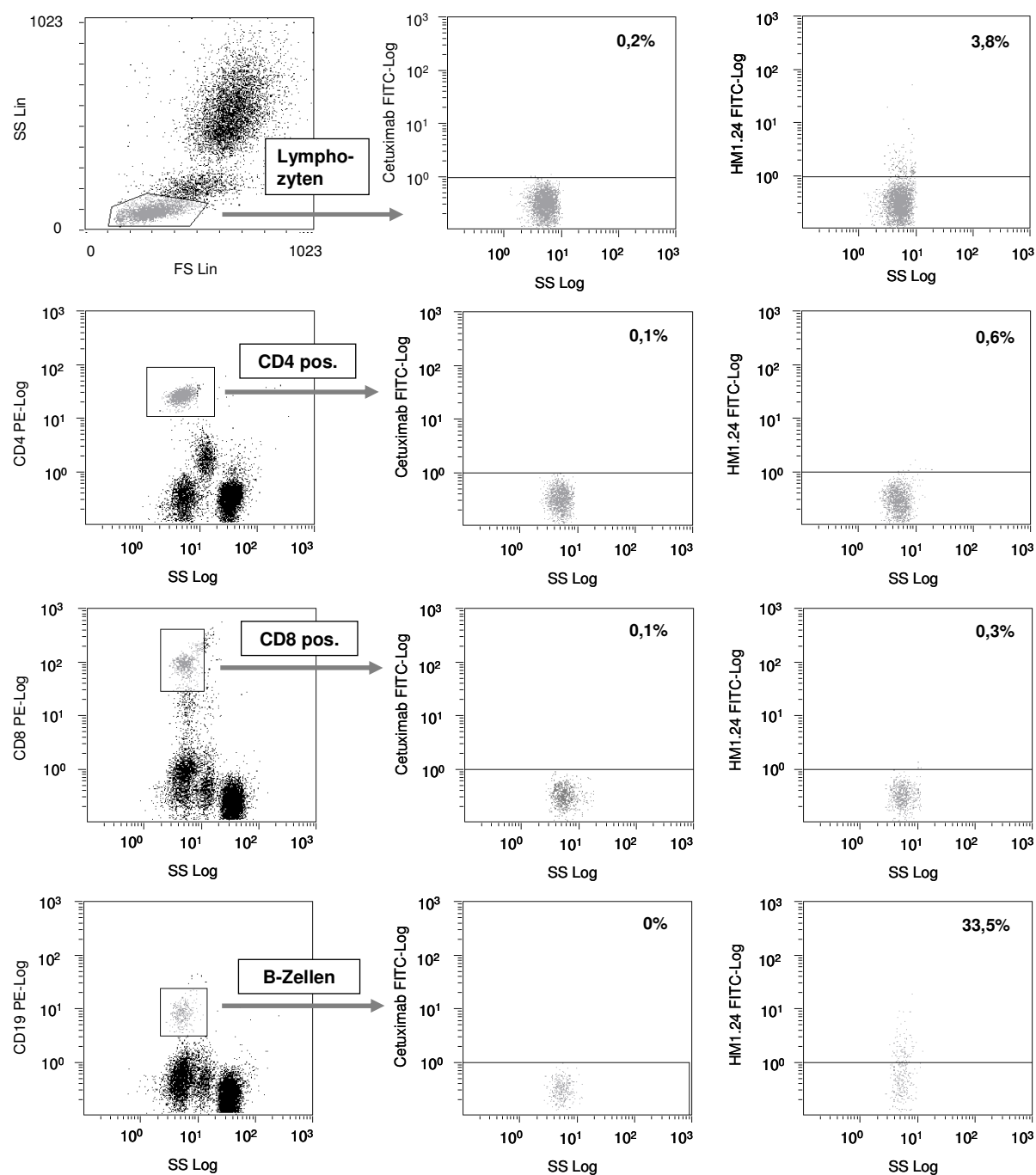
Abb. 7: Nachweis der spezifischen Bindung des direkt markierten HM1.24-FITC an HM1.24-positiven Zellen. Durchflußzytometrische Analyse der Bindung des direkt markierten HM1.24-FITC an (A) HM1.24-positiven INA-6 Zellen mit einer Konzentrationsfärbung von 5 µg/ml. (B) Als Kontrolle wurde direkt markierter Kontroll-IgG1-Antikörper, Cetuximab-FITC, eingesetzt. Es ist keine Bindung nachweisbar.

3.1.2 Untersuchung hämatopoetischer Zellpopulationen auf ihre Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche

Für die Immunfluoreszenzanalyse hämatopoetischer Zellen auf ihre Oberflächenexpression von HM1.24 wurde Vollblut verschiedener gesunder Spender mit CD-Antikörpern, die bestimmte Zellpopulationen definieren, inkubiert sowie mit FITC-markierten HM1.24-Antikörpern und FITC-markierten irrelevanten Kontrollantikörpern (FITC-Cetuximab).

Bei der Lymphozyten-Population ist im Vergleich zum Kontrollantikörper bei 3,8% RFI (*Relative Fluorescence Intensity*) der markierten Zellen eine Bindung von FITC-HM1.24 zu sehen, welches eine Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche bei einer Subpopulation darstellt. CD8-positive Zellen, wie T-Zellen und NK-Zellen, und CD4-positive Zellen der Lymphozytenpopulation, T-Zellen, zeigen keine Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche. 33,5% der CD19-positive B-Zellen weisen eine Expression von HM1.24 auf ihrer Zelloberfläche auf. CD33-positive Zellen lassen sich aufgrund ihrer Expressionsstärke und Granularität in Monozyten und Granulozyten unterscheiden. Nur 3,4% der Granulozyten weisen Markierung mit HM1.24-FITC auf. Monozyten hingegen binden HM1.24-FITC (79,7%) im Vergleich zum irrelevanten Antikörper, was auf eine Expression von HM1.24 auf ihrer Zelloberfläche schließen lässt. Weiterhin zeigen CD56-positive Zellen, wie NK-Zellen und T-Zellen keine Markierung des HM1.24-FITC-Antikörpers auf ihrer Zelloberfläche. Als Kontrolle diente ein irrelevanter FITC-markierter Antikörper, Cetuximab-FITC.

HM1.24 ist somit nicht so breit auf der Zelloberfläche von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wie in der Literatur beschrieben. Nach den in unserem Labor durchgeführten Untersuchungen weisen lediglich B-Zellen und Monozyten eine deutliche Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche auf.



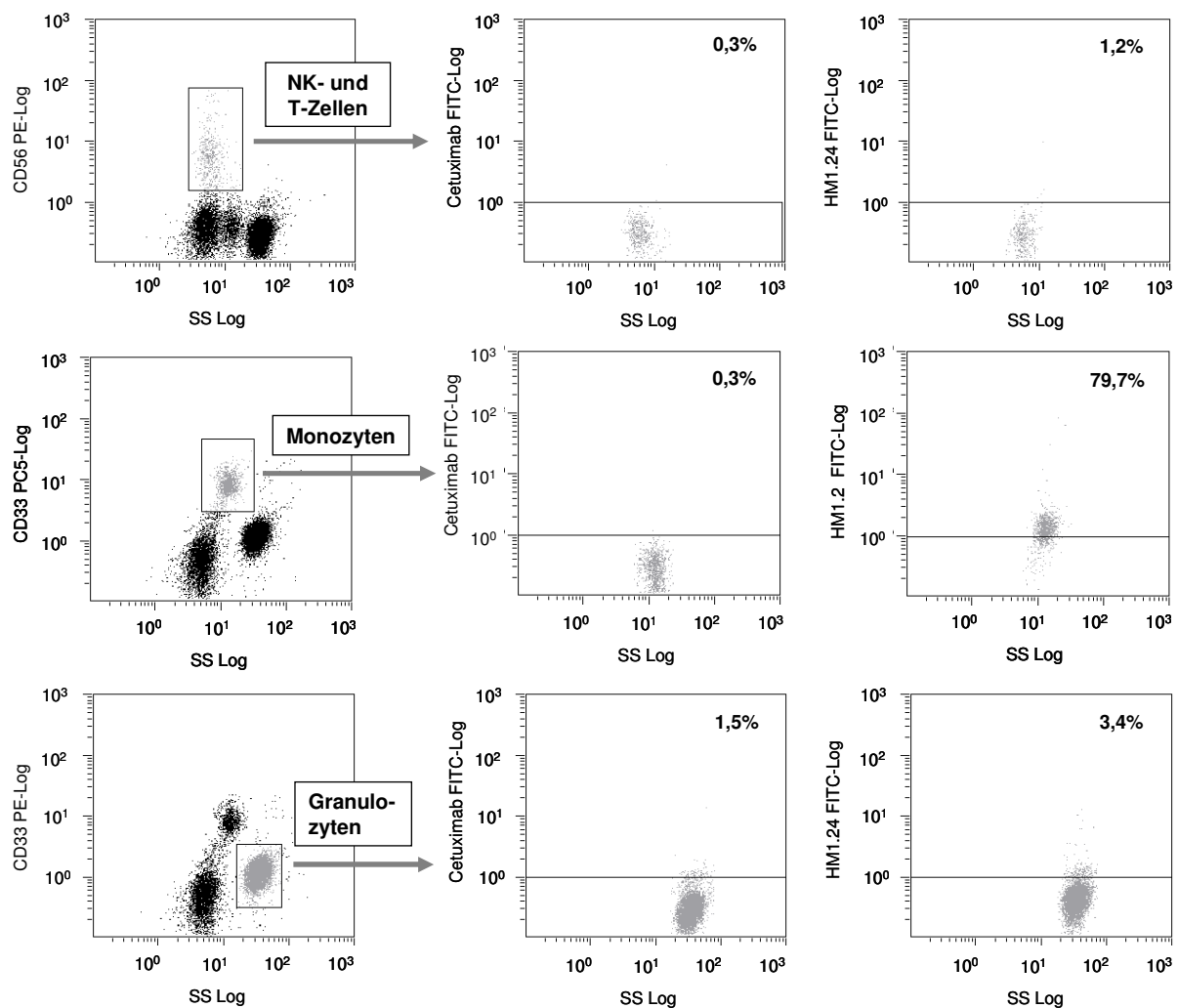


Abb. 8: Darstellung einzelner Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems gesunder Spender mittels Immunfluoreszenzanalysen und deren Expression von HM1.24 auf ihrer Zelloberfläche. In Immunfluoreszenzanalysen wurde die Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche hämatopoetischer Zellpopulationen, die über CD-Antigene definiert wurden, untersucht mittels eines FITC-markierten HM1.24-Antikörpers. Zellpopulationen im zu untersuchten Gate sind jeweils grau dargestellt. Unter der Lymphozytenpopulation weisen B-Zellen eine Expression von HM1.24 (33,5%) auf ihrer Zelloberfläche auf. CD4- sowie CD8-positive Zellen zeigen keine entsprechende Expression. Ebenso zeigen NK-Zellen und T-Zellen nur eine minimale Markierung von FITC-HM1.24 auf ihre Zelloberfläche, auch bei den Granulozyten ist nur eine geringe Markierung zu sehen. Eine deutliche Expression von HM1.24 auf weisen Monozyten auf ihre Zelloberfläche auf (79,7%). Als Kontrolle diente ein FITC-markierter irrelevanter Kontrollantikörper (FITC-Cetuximab).

3.2 Analyse potentieller Effektormechanismen von humanisierten HM1.24-gerichteten IgG1-Antikörpern

Zunächst wurde mit einem humanisierten HM1.24-IgG1 Antikörper untersucht, welche indirekten Effektormechanismen durch HM1.24-gerichtete monoklonale Antikörper vermittelt werden können. Zu diesem Zweck wurde frisches peripheres Blut von gesunden Spendern in mononukleäre Zellen (MNC), polymorphnukleäre Zellen (PMN) und Plasma fraktioniert. Der humanisierte HM1.24-IgG1 wurde in Chrom-Freisetzungs-Experimenten eingesetzt, um die Lyse von HM1.24-positiven ARH-77 Zellen zu vermitteln. Als Effektoren dienten MNC, PMN und mit GM-CSF stimulierte PMN, jeweils mit einem Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 80:1, sowie Plasma. Wie in der Literatur beschrieben, war eine signifikante Lyse der Zielzellen nur in der NK-Zellen enthaltenden MNC-Fraktion nachweisbar, während PMN keine Lyse vermittelten. Auch in der Plasma-Fraktion war keine signifikante spezifische Lyse der Zielzellen zu beobachten, so dass daraus geschlossen werden kann, dass eine Komplement-abhängige Zytotoxizität durch den humanisierten HM1.24-IgG1 nicht stattfindet. Als positive Kontrolle diente ein HLAII-Antikörper (F3.3), der spezifische Lyse der Zielzellen in Anwesenheit von MNC, PMN, und Plasma zeigte. Ansätze ohne Antikörper und ohne Effektorzellen bzw. Versuche mit Kontrollantikörpern, die in diesem Zusammenhang ein irrelevantes Antigen erkennen, zeigten keine Lyse der Zielzellen (nicht in Abb. dargestellt).

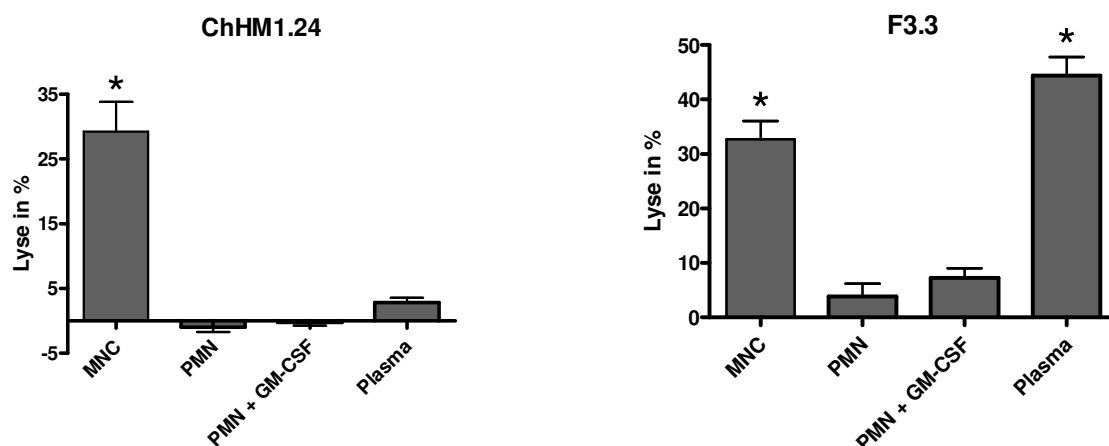


Abb. 9: Identifizierung der Subpopulationen von humanen peripheren Blutlymphozyten, welche die Lyse von ARH-77 Zellen in Verbindung mit dem chimären humanen HM1.24 vermitteln sowie mit F3.3-Antikörper als Positivkontrolle. Frisch isolierte humane MNCs, PMNs wurden als Effektoren in ^{51}Cr -Release Tests mit ARH-77 in

einem E-T-Verhältnis von 80:1 eingesetzt und mit der Plasma-Fraktion verglichen. Der humane HM1.24-IgG1 vermittelte im Vergleich zu einem irrelevanten Antikörper spezifische Lyse mit dem MNC-Ansatz. Eine zelluläre Zytotoxizität vermittelt durch HM1.24 wurde in der PMN-Fraktion nicht gefunden, ebenso hat eine Komplement-abhängige Lyse in der Plasma-Fraktion mit HM1.24 nicht stattgefunden. Als Positivkontrolle diente F3.3; dieser vermittelt spezifische Lyse mit dem MNC-Ansatz sowie Komplement-abhängige Lyse in der Plasma-Fraktion. Eine geringe Lyse wurde mit dem PMN + GM-CSF-Ansatz beobachtet. Signifikante Lyse ($P < 0,05$) ist durch einen Stern (*) gekennzeichnet. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Effektoren von verschiedenen gesunden Spendern

Ein humanisierter HM1.24 Antikörper vermittelt Tumorzelllyse über die Rekrutierung von NK-Zellen. Die Effizienz von Antikörpern lässt sich möglicherweise durch Verwendung bispezifischer Antikörper verbessern. So lassen sich NK-Zellen gezielt über die CD16 aktivieren. CD16-gerichtete bispezifische Antikörper könnten somit zur verbesserten Rekrutierung von NK-Zellen führen.

3.3 Konstruktion und Charakterisierung eines HM1.24-spezifischen scFv Fragments

Zur Herstellung bispezifischer scFv Antikörper werden zwei scFv-Fragmente genetisch miteinander verknüpft. Ein gegen CD16 gerichtetes scFv-Fragment wurde in Vorarbeiten zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Fey in Erlangen aus der Hybridomzelllinie 3G8 (Bruenke, Fischer et al. 2004) kloniert und als disulfid-stabilisierte Variante mit verbesserter Serumstabilität modifiziert. Für das beschriebene Projekt lag das scFv-Fragment bereits kloniert in einem Vektor zur Expression in Säugetierzellen vor. Ein HM1.24 gerichtetes scFv-Fragment wurde entsprechend publizierter V-Region-Sequenzen durch Gen-Synthese von der Firma Entelechon (Regensburg) synthetisiert.

		SfiI	
-2	~~~~~	M A D Y K	
1	GGCCAGCGC GGCATGGCG ATTACAAAGA TATCGTAATG ACCCAGTCTC ATAAGTTCAT GAGCACCAGC GTGGGCGACA GGGTTAGCAT TACTTGCAAA		
	CCGGGTGCGC CGGTACCGGC TAATGTTTCT ATAGCATTAC TGGGTACAGAG TATTCAAATA CTCGTGGTCG CACCGCTGT CCAATCGTA ATGAACGTTT		
-2	A S Q D Y N T A Y A V Y Q Q K F G Q S P K L L I Y S A S N R Y T B Y		
101	GCCTCAGG ACCTGAATAC AGCCGTGGCC TGGTACCAGC AGAAGCCTGG CCACTCTCCC AAGCTGCTCA TCTACTCAGC ATCTAACCGT TACACCGGTG		
	CGGAGTGTC TGCATTATG TCGGCACCGG ACCATGGTCG TCTTCGGACC GGTACAGAGG TTCGACGAGT AGATGAGTCG TAGATTGGCA ATGTGGCCAC		
-2	Y P D R I T G S G S G T D F T F T I S S Y Q A E D L A L Y Y C Q Q H		
201	TGCCTGATAG GATCACCAGT TCCGGTAGCG GAACTGACTT TACATTACCA ATCAGTAGCG TCCAGGCCGA AGACCTGGCA CTGTACTATT GTCACAGCA		
	ACGGACTATC CTAGTGGCCA AGGCCATCGC CTTGACTGAA ATGTAAGTGT TAGTCATCGC AGGTCCGGCT TCTGGACCGT GACATGATAA CAGTCGTCGT		
-2	H Y S T F F T F G S G T K L E I K R G G G G G S G G G G G S G G G G S G		
301	CTATAGCACT CCTTTACAT TTGGGAGTGG GACCAAGCTC GAGATCAAGC GAGGTGGAGG TGGCAGTGGG GGTGGAGGCT CAGGTGGAGG GGGCAGCGGT		
	GATATCGTGA GGGAAATGTA AACCTCACC CTGGTTCGAG CTCTAGTTGG CTCCACCTCC ACCGTACCT CCACCTCCGA GTCCACCTCC CCCGTCGCCA		
-2	G G G S Q V G Q L D Q S G A E L A R P R A S V K L S C K A S G Y T F T		
401	GGCGTGAT CCAAGTTCA GCTGACAGC TCCGGAGCAG AACTGGCCAG GCCTGGTGCT TCTGTGAAT TGTCTTGCAA GGCAAGTGGC TATACCTTCA		
	CCGCCACTA GGGTCCAAGT CGACGTCGTC AGGCTCGTC TTGACCGGTC CGGACCAAGA AGACACTTCA ACAGAACGTT CCGTTCACCG ATATGGAAGT		
-2	T P T V M Q W V Y K Q R F G Q G L E V I S S I F P G D G D T R Y S Q K		
501	CCCATACTG GATGCACTGG GTAAAGCAGC GACCAAGCCA GGGCCTCGAG TGGATTGGCT CCATCTTCCC AGGGGACGGT GATACCAAGT ATTCACAGAA		
	GGGGTATGAC CTACGTACCC CATTTCGTCG CTGGTCCGGT CCCGGAGCTC ACCTAACCGA GGTAGAAAGG TCCCTGCCA CTATGGTCCA TAAGGGTCTT		
-2	K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L S I L A F E D S A V Y Y C		
601	GTTCAAAGGC AAAGCTACCC TTACTGCTGA CAATCTCTCT TCAACAGCTT ACATGCAGCT TAGCATCCTG GCTTTTGAGG ACAGTGCTGT CTACTATTGT		
	CAAGTTTCCG TTTCGATGGG AATGACGACT GTTTAGGAGA AGTTGTCGAA TGTACGTCGA ATCGTAGGAC CGAAACTCC TGTCACGACA GATGATAACA		
-2	A R G L R R G G Y Y F D Y V G Q G T T L T Y S		SfiI
701	GCCAGAGGC TGGCAGAGG AGGCTACTAT TTCGACTATT GGGGACAGGG GACTACATTG ACCGTACGCT CGGCCTCGGG GGCG		
	CGGTCTCCG ACGGCTCTCC TCCGATGATA AAGCTGATAA CCGCTGTCCC CTGATGTAAC TGGCAGTCGA GCCGAGGCC CCGG		

Abb. 10: V-Region-Sequenz des HM1.24 gerichteten scFv-Fragmentes. Blau (Zeile 1 bis 301): VL-Region; Grün (Zeile 301 bis 401): (Gly₄Ser)₄-Linker; Gelb (Zeile 401 bis 701): VH-Region. SfiI Restriktionsstellen am 5'- und 3'-Ende.

Dabei wurde die VL-Region über eine codierende Sequenz für einen 20 Aminosäuren langen flexiblen Linker (Gly₄Ser)₄ mit der VH-Region verknüpft und damit als Einzelkettenmolekül entworfen. Im Rahmen der Synthese wurden die Codons zur optimalen Expression in humanen Zell-Linien optimiert und potentielle RNA-Sekundärstrukturen, die möglicherweise die Expression negativ beeinflussen könnten, weitgehend eliminiert. An das 5'- und 3'-Ende wurden SfiI Restriktionsstellen angefügt, um eine Klonierung des scFvs in das im Labor etablierte Cassetten-System zur Expression von bispezifischen scFvs in 293T-Zellen zu ermöglichen. Diese Strategie wurde verfolgt, da die geplanten bispezifischen Antikörper erfahrungsgemäß nur sehr ineffizient in E.coli hergestellt werden können. Das scFv-Fragment wurde zunächst in verschiedene Vektoren kloniert, die eine Expression des scFv als Fusion mit einem grün fluoreszierenden Protein (gfp+; Peipp et al. 2004) in Fusion mit dem humanem IgG1-Fc sowie die Expression als nicht fusioniertes Protein in E.coli erlauben.

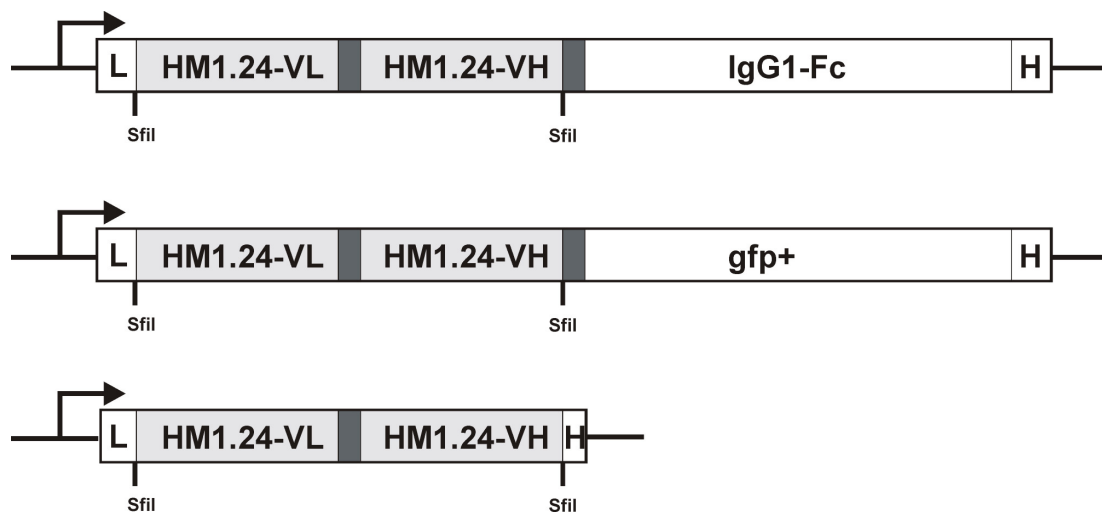


Abb. 11: Verschiedene Vektoren des HM1.24-scFv-Fragmentes Das HM1.24-spezifische scFv-Fragment wurde durch genetische Fusion der VL- und VH-Region eines HM1.24-gerichteten Antikörpers hergestellt und über einen 20 Aminosäure langen flexiblen Polypeptidlinker miteinander verknüpft. Für weitere Analysen wurde das scFv-Fragment als GFP-Fusionsprotein exprimiert oder mit humanem IgG1-Fc verknüpft. L: Sekretionsleader; S: StrepII-Tag; H: Hexa-Histidin-Tag; graue Box: flexibler 20 Aminosäuren langer (Gly₄Ser)₄-Linker; GFP+: grün fluoreszierendes Protein.

Zunächst wurde der Vektor pSEC-HM1.24-gfp+ transient in 293T-Zellen transfiziert und das HM1.24-gfp+ Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand affinitätschromatographisch gereinigt. Das gereinigte Protein wurde auf Bindefähigkeit an mit HM1.24 transfizierte 293T-Zellen überprüft und HM1.24-positive INA-6 Zellen geprüft. Als Kontrollen dienten untransfizierte 293T-Zellen und Antigen-negative Raji Zellen.

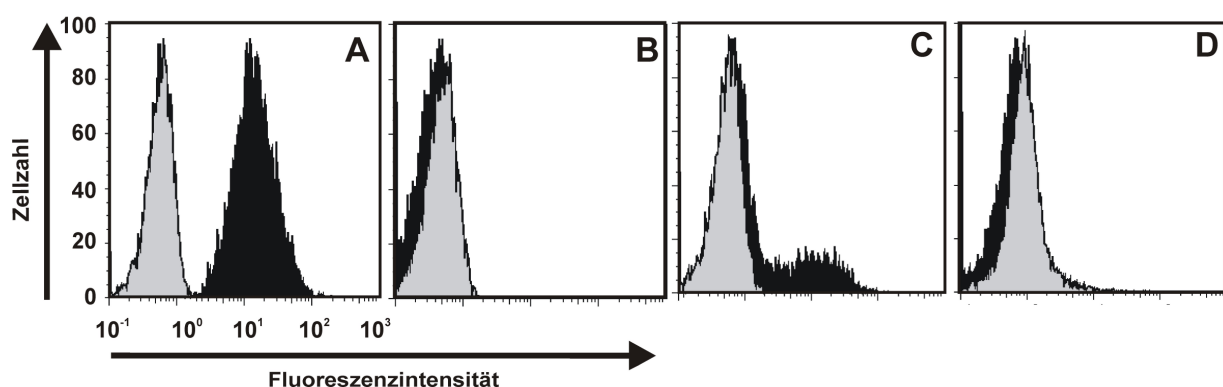


Abb. 12: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des HM1.24-scFv-GFP an verschiedene antigen-positive und antigen-negative Zellen. Der Überstand des in 293T-Zellen transient transfizierten HM1.24-GFP wurde getestet an: (A) HM1.24-positiven INA-6-Zellen; (B) antigen-negativen Raji-Zellen; (C) HM1.24 transfizierten 293T-Zellen; (D) nicht-transfizierte 293T-Zellen.

Im Durchflusszytometer zeigte das gereinigte Protein Bindung an HM1.24 transfizierte 293T-Zellen und INA-6 Zellen, nicht jedoch an untransfizierte 293T-Zellen bzw. Raji-Zellen. Um die HM1.24 Spezifität weiter zu überprüfen, wurden Kompetitionsstudien mit dem parentalen HM1.24-IgG1 Antikörper durchgeführt.

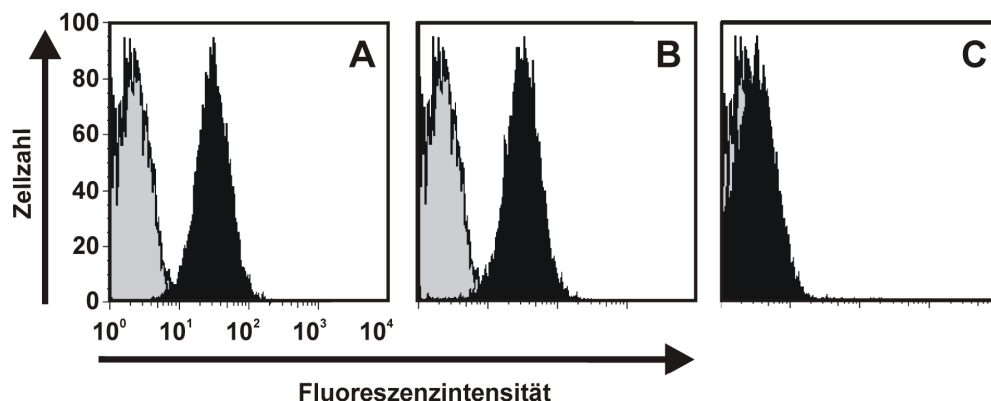


Abb. 13: Durchflusszytometrische Analyse der kompetitiven Bindung des HM1.24-scFv-GFP an INA-6-Zellen. (A) HM1.24-scFv-GFP; (B) HM1.24-scFv-GFP in Anwesenheit eines irrelevanten IgG1-Antikörpers im Überschuss; (C) HM1.24-scFv-GFP in Anwesenheit des HM1.24-IgG1-Antikörpers im Überschuss. Überstand von nicht-transfizierten 293T-Zellen diente als Negativkontrolle (grau); Überstand von HM1.24-scFv-GFP exprimierten 293T-Zellen (schwarz)

In Anwesenheit von einem Überschuss an parentalem HM1.24 Antikörper wurde die Bindung des HM1.24-scFv-gfp+ Fusionproteins verhindert (Abb. 13 C). In Anwesenheit eines irrelevanten IgG1-Antikörpers (B) wurde das Fluoreszenzsignal im Vergleich zu Kontrollfärbungen ohne zusätzlichen Antikörper (A) nicht verändert. Diese Experimente belegen, dass das neu konstruierte scFv Fragment HM1.24 spezifisch bindet und dass die Bindespezifität des parentalen Antikörpers durch die Änderung des Molekül-Formats nicht grob verändert wurde.

3.4 Konstruktion des rekombinanten bsscFv [HM1.24xCD16]

Ziel ist es zu untersuchen, ob die NK-Zell-Aktivierung erhöht werden kann über die gezielte Rekrutierung über CD16 mit Hilfe CD16-gerichteter bispezifischer Antikörper. Die Herstellung bispezifischer Antikörper benötigt zunächst die Herstellung von zwei scFv-Fragmenten, die anschließend miteinander verknüpft werden.

In Vorversuchen wurden die beiden scFv gegen HM1.24 und CD16 kloniert. Diese scFv-Fragmente wurden genutzt, um einen rekombinanten bispezifischen scFv [HM1.24xCD16] herzustellen. Das scFv-Fragment für die Zielzelle (HM1.24) und das scFv-Fragment für die Effektorzelle (CD16) sind im Tandem-Format hintereinander angeordnet und über einen flexiblen, 20 Aminosäuren langen Polypeptidlinker ((Gly₄Ser)₄-Linker) miteinander verknüpft. Die Expression des rekombinanten bsscFv [HM1.24xCD16] steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Für die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Zellkulturmedium dient Igκ-Sekretionsleader. Für eine affinitätschromatische Proteinaufreinigung und den spezifischen Nachweis des Proteins befindet sich am C-Terminus ein c-myc-Tag und Hexa-Histidin-Tag, sowie auf der N-terminalen Seite zusätzlich ein StrepII-Tag.

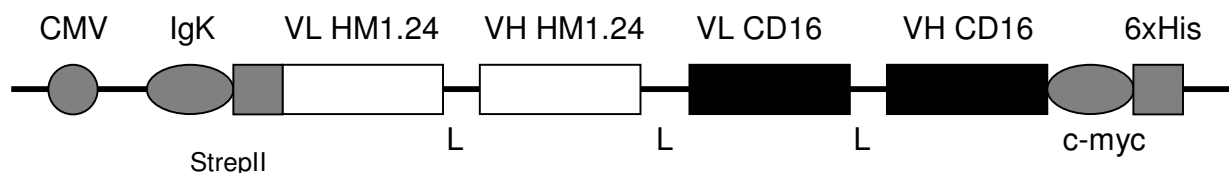


Abb. 14: Design des rekombinanten bsscFv Antikörpers [HM1.24xCD16]. CMV: Promotor des Cytomegalie-Virus; IgK: Sekretionsleader; VL, VH: DNA-Sequenzen codierend für die variablen Regionen der leichten und der schweren Ketten; L: 20 Aminosäuren langer flexibler Linker (Gly₄Ser)₄; c-myc: codierende Sequenz für den myc-Tag; 6xHis: codierende Sequenz für den Hexa-Histidin-Tag; Strep-II: codierende Sequenz für den Strep-II-Tag.

Frühere Untersuchungen ergaben, dass das CD16scFv aufgrund der Entfaltung der scFv-Komponenten nur eine relativ geringe Stabilität im Serum aufweist (Bruenke, Barbin et al. 2005). Für die Stabilisierung enthält das scFvCD16-Fragment eine zusätzliche intramolekulare Disulfidbrücke, die zwischen der variablen leichten und schweren Kette liegt. Somit soll ein Entfalten der variablen Kette verhindert werden ohne dabei die Antigenbindung zu beeinflussen.

3.4.1 Expression und Reinigung

Säugetierzellen stellen ein geeignetes System zur Expression rekombinanter Proteine dar. Zur Expression des rekombinanten Proteins wurde die epitheliale Nierenkarzinom-Zelllinie 293T gewählt. Diese adhärent wachsenden 293T-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für den bsscFv mittels Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert und im Anschluss an die Transfektion wurde der Zellkulturüberstand über eine Dauer von 7 Tagen gesammelt. Der Zellkulturüberstand wurde mittels Affinitätschromatographie als erstes über den C-terminalen Hexa-Histidin-Tag aufgereinigt. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen der α His-Aufreinigung, in denen sich das Protein nachweisen ließ, vereinigt und über den N-terminalen StrepII-Tag aufgereinigt. Die Überprüfung der Aufreinigung erfolgte mittels Coomassie gefärbten SDS-Gelen und Western-Transfer-Analysen (siehe Abbildung 15). Im Coomassie gefärbten Gel waren in den Elutionsfraktionen 2/3 jeweils eine Bande von ca 60-65 kDa nachzuweisen, was dem erwarteten Molekulargewicht des bsscFv [HM1.24xCD16] entspricht. In Western-Transfer-Experimenten wurde der bsscFv spezifisch mittels eines anti-His-Tag Antikörpers nachgewiesen, und auch hier wurde eine Bande bei ca 60 bis 65 kDa detektiert. Da weder im Coomassie gefärbten SDS-Gel noch im Western-Transfer Abbauprodukte nachweisbar waren, wurde angenommen, dass das aufgereinigte Protein intakt war.

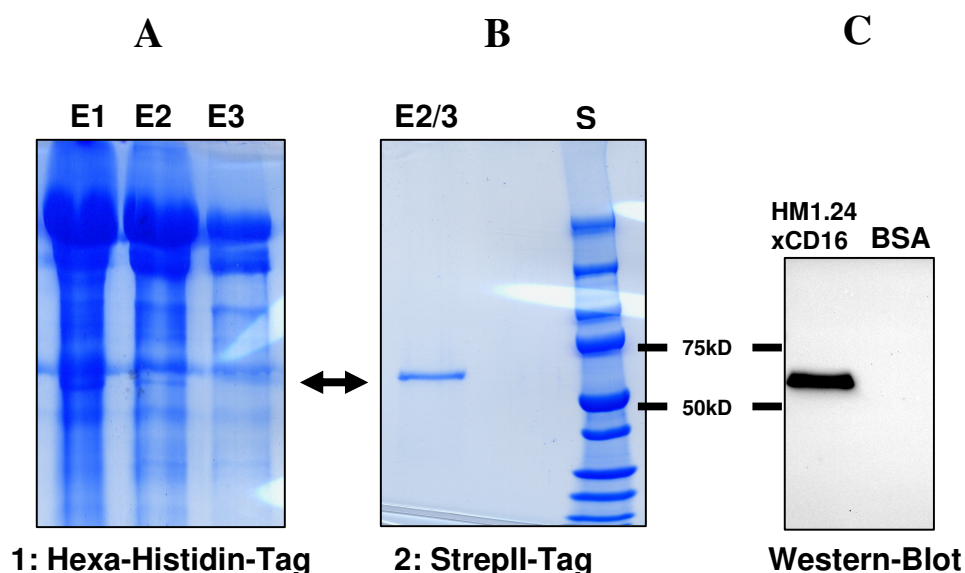


Abb. 15: Aufreinigung und Nachweis des rekombinanten bsscFv [HM1.24xCD16] aus 293T-Zellen. Die Aufreinigung erfolgte affinitätschromatographisch zuerst über den 6xHistidin-Tag und im zweiten Schritt über den

StrepII-Tag. (A) Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel zur Abschätzung der Reinheit des aufgereinigten bsscFv nach der 6xHis-Tag-Reinigung. (B) Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel nach der Strep-Tag-Reinigung zur Abschätzung der Reinheit des bsscFv. S: Größenstandard; E1,E2,E3: Elutionsfraktionen
(C) Nachweis des bsscFv in einem Western-Transfer-Experiment mit einem anti-His-Tag Antikörper

Ziel der zweistufigen Proteinaufreinigung war es, eine höhere Reinheit des rekombinanten Proteins zu erreichen. In Abbildung 15 sind zwei Coomassie gefärbte SDS-Gele dargestellt. In A ist der Zustand nach der ersten Aufreinigung über den His-Tag abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass neben der Bande des bsscFv-Antikörpers zahlreiche Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen enthalten sind. Nach der zweiten Aufreinigung über den StrepII-Tag ist im Coomassie gefärbten SDS-Gel, in B dargestellt, neben einer minimalen Verunreinigung auf Höhe von 70 kDa nur noch eine Bande mit der erwarteten Größe des bsscFv sichtbar. Eine zweistufige Proteinaufreinigung ist zwar mit einem Verlust des rekombinanten Proteins verbunden ist, (da auch in der Waschfraktion Protein nachweisbar war), jedoch steht der exprimierte Antikörper für weitere funktionelle Tests in einer höheren Reinheit zur Verfügung.

Anhand von Coomassie gefärbter SDS-Gele wurde mit Hilfe von BSA-Verdünnungsreihen die Konzentration des aufgereinigten bsscFv-Antikörpers abgeschätzt. Die erzielten Ausbeuten an rekombinanten HM1.24xCD16 lagen in der Regel bei 50µg aufgereinigtem Protein pro Liter Zellkulturüberstand transfizierter 293T-Zellen.

3.4.2 Nachweis spezifischer Bindung des bsscFv

Um die Fähigkeit der aufgereinigten Proteine zu überprüfen, an ihre Zielantigene, CD16 und HM1.24, spezifisch zu binden, wurden Immunfluoreszenzanalysen mit den bsscFv auf Antigen-positiven Zellen durchgeführt. Als Antigen-positive Zellen dienten für HM1.24 ARH-77- und für CD16 CD16-transfizierte BHK. Als Negativkontrollen dienten Antigen-negative Zellen, CD89-transfizierte BHK. Der rekombinante bsscFv HM1.24xCD16 zeigte spezifische Bindung an HM1.24- sowie an CD16-positive Zellen, auf Antigen-negativen Zellen war keine Bindung nachweisbar. Daraus wurde geschlossen, dass der bsscFv HM1.24xCD16 in der Lage ist, sowohl an HM1.24, als auch an CD16 zu binden.

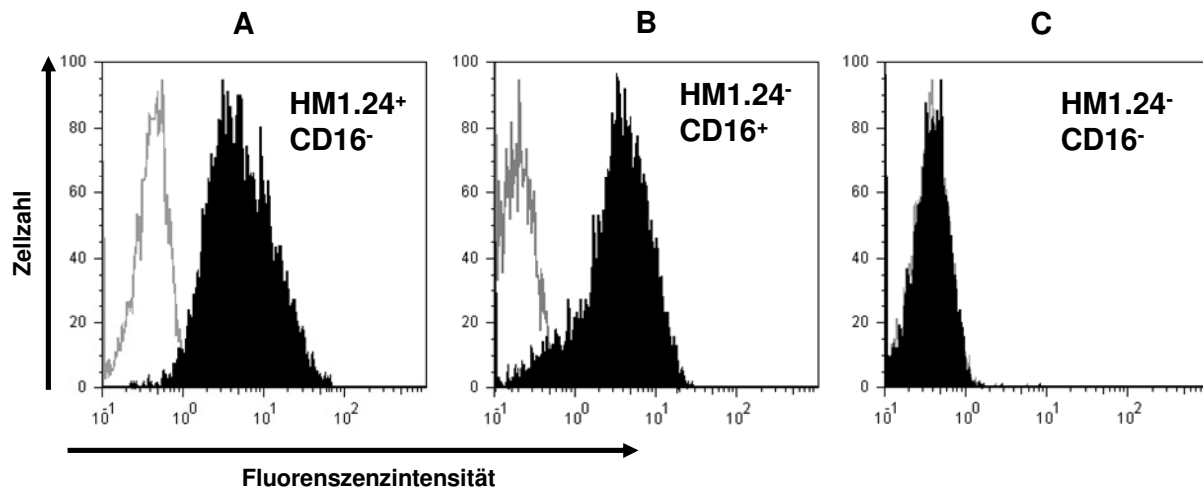


Abb. 16: Spezifische Bindung des bsscFv [HM1.24xCD16]. Durchflußzytometrische Analysen der Bindung des bsscFv an (A) HM1.24-positive Zellen ARH-77; (B) CD16-transfizierte BHK-Zellen; (C) untransfizierte (CD89-transfiziert) BHK-Zellen.

□ Kontrolle; ■ HM1.24xCD16

3.5 Vermittlung von Zytotoxizität durch den bispezifischen scFv HM1.24xCD16

Nachdem der bsscFv HM1.24xCD16 spezifische Bindung an beide Zielantigene zeigte, wurde dieser auf seine Fähigkeit untersucht, Lyse HM1.24-positiver Zellen durch Rekrutierung von Effektorzellen zu induzieren. Die Versuche zur Vermittlung von ADCC Reaktionen wurden in Form von klassischen ⁵¹Cr-Release-Assay eingesetzt. Die Tests wurden mit frisch isolierten, unstimulierten mononukleären Zellen aus verschiedenen gesunden Spendern und verschiedenen B-Zell-Linien bzw. Myelomlinien durchgeführt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal, jeweils in Triplikaten, durchgeführt. Die Werte wurden gemittelt. Weiterhin war es Ziel, die Effizienz des bsscFv HM1.24xCD16 mit der des humanisierten monoklonalen HM1.24 zu vergleichen.

Zunächst wurde die Fähigkeit des bsscFv, zytolytische Prozesse zu induzieren, an der EBV-transformierten B-Zell-Linie ARH-77 durchgeführt. Abb. 17 zeigt, dass sowohl der monoklonale

Antikörper HM1.24 als auch der bsscFv HM1.24xCD16 eine Lyse der Zielzellen induziert. Die spezifische Lyse des bsscFv liegt hierbei jedoch höher als die des monoklonalen Antikörpers.

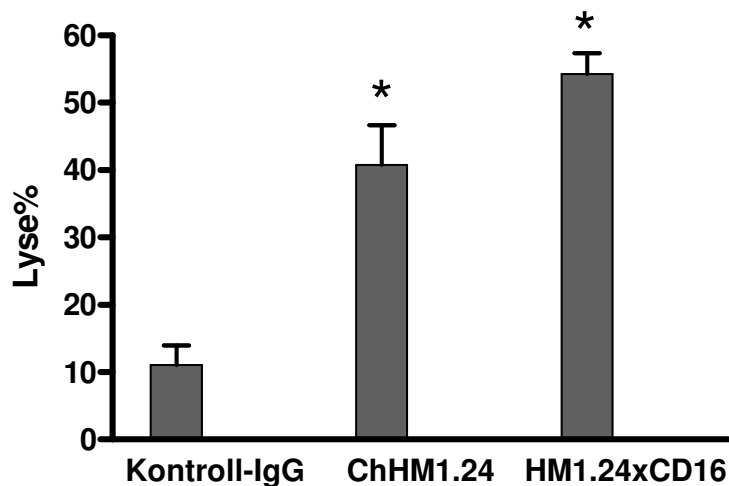


Abb. 17: Der chimäre HM1.24 und der rekombinante bsscFv [HM1.24xCD16] vermitteln spezifische Lyse an ARH-77. Die Zytotoxizität des bsscFv wurde mit der des monoklonalen chimären HM1.24 verglichen. Als Zielzellen wurde die maligne B-Zell-Linie ARH-77 in ⁵¹Cr-Release-Tests mit frisch isolierten MNCs als Effektoren in einem E:T Verhältnis von 80:1 verwendet und einer Antikörperkonzentration von 4µg/ml (Kontroll-IgG, ChHM1.24) bzw. 2µg/ml (HM1.24xCD16). Sowohl der bsscFv als auch der ChHM1.24 induzierte spezifische Lyse der Zellen. Die spezifische Lyse durch den bsscFv ist dabei höher als die des monoklonalen Antikörpers. Ein Kontrollantikörper zeigte keine bzw. nur geringe Lyse. Signifikante Lyseraten mit einem Wert $P < 0,05$ sind mit einem Stern (*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit MNCs von verschiedenen gesunden Spendern.

In den Zytotoxizitätstest wurden die Antikörper in steigenden Konzentrationen eingesetzt (siehe Abb. 18). Der bsscFv HM1.24xCD16 sowie der humanisierte HM1.24-IgG1 vermitteln spezifische Lyse der Zielzellen ARH-77 in Abhängigkeit der eingesetzten Antikörperkonzentrationen. Das Effektor-Target-Verhältnis (E-T Verhältnis) beträgt gleich bleibend 80:1. Die maximale Lyse liegt beim bsscFv HM1.24xCD16 signifikant höher als beim monoklonalen Antikörper HM1.24-IgG1 bei gleichen molaren Konzentrationen. Optimale Lyseraten wurden ab einer Konzentration von 1µg/ml erreicht, was ca. 15nM entspricht. Ein irrelevanter Antikörper, anti-EGFR (Cetuximab) und Puffer-Kontrollen, zeigen keine Lyse der Zielzellen.

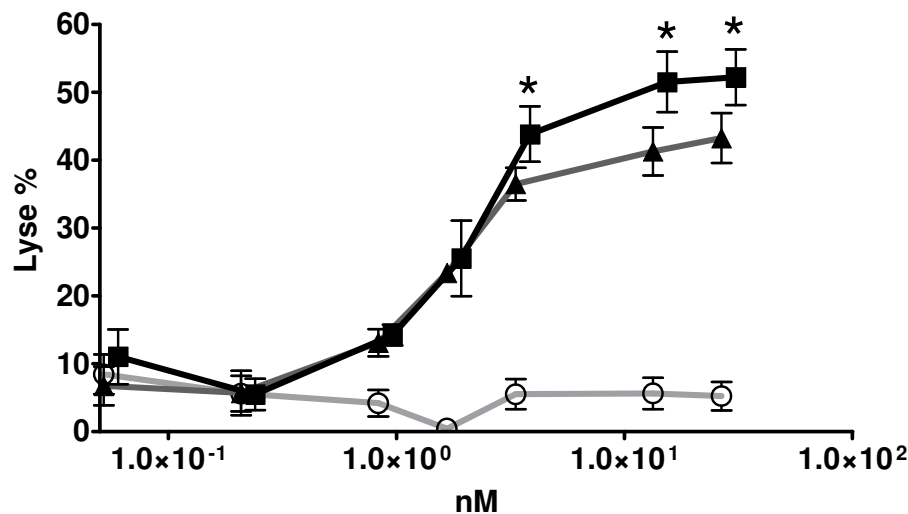


Abb. 18: Abhängigkeit der spezifischen Tumorzelllyse von ARH-77 von der Antikörperkonzentration. Der rekombinante bsscFv [HM1.24xCD16] und der monoklonale ChHM1.24 vermitteln spezifische Lyse von ARH-77 Zellen in 51Cr-Release-Experimenten mit frisch isolierten MNCs aus verschiedenen gesunden Spendern in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Antikörper bei gleich bleibenden E:T Verhältnis von 80:1. Die maximale Lyse des bsscFv liegt signifikant höher als die des monoklonalen Antikörpers HM1.24-IgG1 bei gleichen molaren Konzentrationen. Ein irrelevanter Antikörper zeigt keine Lyse der Zielzellen. Signifikante Lyseraten mit einem Wert $P < 0,05$ sind mit einem Stern (*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Effektoren von verschiedenen gesunden Spendern.
 ○ Kontroll-IgG1; ▲ ChHM1.24; ■ HM1.24xCD16

Die spezifische Lyse zeigte ebenfalls eine strenge Korrelation zwischen dem verwendeten Verhältnis von Effektorzellen zu Zielzellen bei gleichbleibenden Antikörper-Konzentrationen von $0,25 \mu\text{g/ml}$ (siehe Abb. 19). Der bsscFv HM1.24xCD16 sowie der monoklonale HM1.24-IgG1 vermitteln zelluläre Zytotoxizität über einen breiten Bereich verschiedener Effektorzell-zu-Zielzell Verhältnisse, die mit dem Anstieg der Effektorzellen im Verhältnis zu den Zielzellen zunimmt. Nahezu maximale Lyseraten sind bereits ab einem E-T Verhältnis von 40:1 zu beobachten. Auch hier ist zu erkennen, dass der bsscFv HM1.24xCD16 signifikant höhere Lyseraten aufweist als der humanisierte monoklonale HM1.24-IgG1. In Kontrollexperimenten mit Ansätzen, in denen sich Antikörper ohne Effektorzellen befanden, wurde keine Lyse induziert. Ebenso wurde in Ansätzen mit Effektorzellen ohne Antikörper keine NK-Zell abhängige Lyse beobachtet (nicht in Abbildung gezeigt).

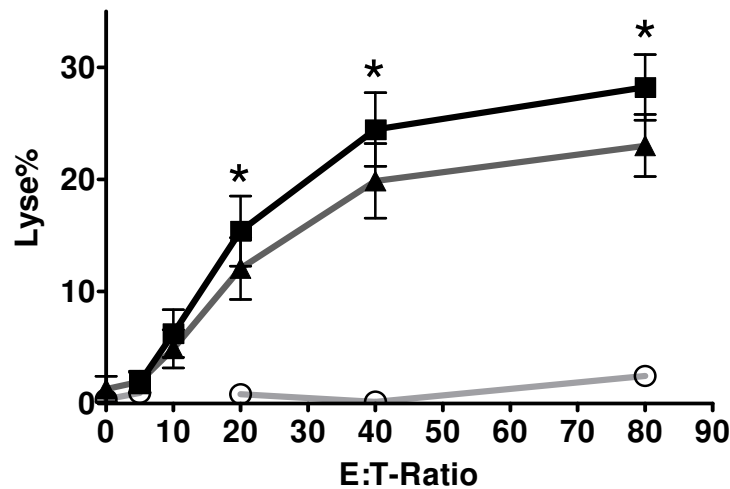


Abb. 19: Abhängigkeit der spezifischen Tumorzelllyse von ARH-77 von dem Effektorzell-zu-Zielzell Verhältnis. Der rekombinante bsscFv [HM1.24xCD16] und der monoklonale ChHM1.24 vermitteln spezifische Lyse von ARH-77 Zellen in ^{51}Cr -Release-Experimenten mit frisch isolierten MNCs aus verschiedenen gesunden Spendern in Abhängigkeit von dem eingesetzten E:T Verhältnis bei gleichbleibenden Antikörperkonzentrationen von 0,25 µg/ml (bsscFv). Die zelluläre Zytotoxizität beider Antikörper nimmt mit dem Anstieg der Effektoren im Verhältnis zu den Zielzellen zu. Optimale Lyseraten sind schon ab einem E:T Verhältnis von 40:1 zu beobachten, wobei der bsscFv signifikant höhere Lyseraten aufweist als der monoklonale Antikörper. Ein irrelevanter Antikörper zeigt keine Lyse der Zielzellen. Signifikante Lyseraten mit einem Wert $P < 0,05$ sind mit einem Stern (*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Effektoren von verschiedenen gesunden Spendern.

○ Kontroll-IgG1 (0,5 µg/ml); ▲ ChHM1.24 (0,5 µg/ml); ■ HM1.24xCD16 (0,25 µg/ml)

Auf Grund dieser Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass der zur Tumorlyse führende Mechanismus die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität ist, da ein strenger Zusammenhang der Antikörperkonzentrationen und des Effektor-zu-Zielzell Verhältnisses beobachtet wurde.

Um zu zeigen, dass die Lyse spezifisch über den bsscFv HM1.24xCD16 vermittelt wird, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. In Zytotoxizitätstests wurden dem bsscFv HM1.24xCD16 zum einen CD16-Antikörper im Überschuss zugefügt und zum anderen ein unspezifischer Antikörper. In Abb. 20 ist zunächst die durch den bsscFv vermittelte Lyse der Zielzellen ARH-77 zu erkennen. Nach Zugabe des anti-CD16 Antikörpers (3G8) ist keine Lyse zu beobachten, da die Bindung des bsscFv an Effektorzellen durch CD16 Antikörper blockiert wird. Durch Zugabe eines irrelevanten Kontroll-Antikörpers, in diesem Fall anti-CD7 Antikörper (TH-69), wird die Lyse der Zielzellen durch den bsscFv nicht beeinflusst. Zusätzlich ist gezeigt,

dass der CD16 sowie der Kontroll-Antikörper bei alleinigem Einsatz in Zytotoxizitätstests keine signifikante Lyse vermitteln, so dass davon auszugehen ist, dass die Zelllyse durch den bsscFv HM1.24xCD16 induziert wird. Somit ist davon auszugehen, dass keine unspezifische Aktivierung der NK-Zellen durch Antikörperbindung an CD16 stattfindet. Der bsscFv vermittelt Antikörper-abhängige Tumorzelllyse über die Rekrutierung von CD16-positiven Effektorzellen.

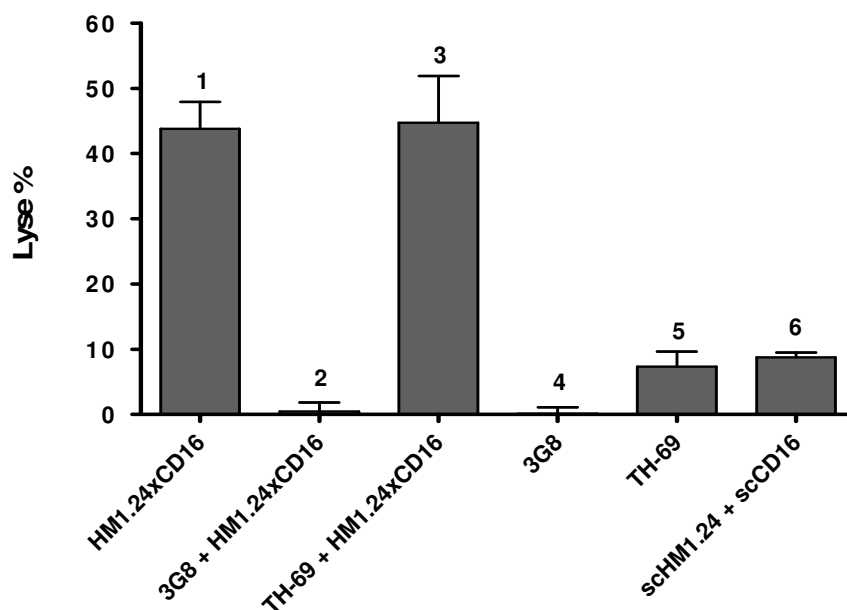


Abb. 20: Nachweis der spezifischen Lyse der Zielzellen durch den bsscFv [HM1.24xCD16]. Der rekombinante bsscFv wurde zum Nachweis seiner zellulären Zytotoxizität/Induktion der spezifischen Tumorzelllyse der ARH-77 Zellen in ⁵¹Cr-Release-Experimenten mit frisch isolierten MNCs aus verschiedenen gesunden Spendern eingesetzt. (1) Spezifische Tumorzelllyse durch den bsscFv (0,25µg/ml). (2) Dem bsscFv wurde ein CD16-Antikörper (3G8) in Überschuss zugefügt (10µg/ml), die Tumorzelllyse wurde somit blockiert. (3) Dem bsscFv wurde ein unspezifischer Antikörper (TH-69; anti-CD7) zugefügt (10µg/ml), beeinflusst Lyse der Zielzellen nicht. (4) Alleiniger Einsatz von 3G8 (10µg/ml), vermittelt keine Tumorzelllyse. (5) Alleiniger Einsatz von TH-69 (10µg/ml), vermittelt keine Tumorzelllyse. (6) Einsatz von nicht miteinander kovalent verbundenen scFv-Fragmenten von HM1.24 und CD16, es lässt sich keine Tumorzelllyse beobachten. Antikörper in äquimolaren Konzentrationen.

In einem weiteren Kontrollexperiment wurden die scFv-Fragmente von HM1.24 und von CD16, nicht kovalent miteinander verbunden und somit nicht auf einer Kette sitzend, eingesetzt (siehe Abb. 20, Balken 6). Auch hier lässt sich keine Lyse der Zielzellen induzieren, da keine Kreuzvernetzung zwischen Effektorzellen und Tumorzellen stattfindet.

Aufgrund dieser verschiedenen Kontrollexperimente wurde gezeigt, dass die Tumorzelllyse durch den bsscFv induziert wird, indem dieser die Tumorzelle, durch seine Bindungsspezifität

gegen HM1.24, und die Effektorzelle, durch seine Bindungsspezifität gegen CD16, in räumliche Nähe bringt und eine zytolytische Antwort induziert.

3.5.1 Tumorzelllyse von Myelomzellen

Als nächstes war es Ziel, die Fähigkeit des bsscFv HM1.24xCD16 zu untersuchen, die Tumorzelllyse von Myelomlinien zu induzieren. Zunächst wurde die Oberflächenexpression von HM1.24 an verschiedenen Myelomlinien untersucht. Zu diesem Zweck wurden Immunfluoreszenzanalysen mit HM1.24-FITC markierten Antikörpern durchgeführt. Als Negativkontrolle diente ein irrelevanter Antikörper, Cetuximab-FITC. Eine Oberflächenexpression von HM1.24 zeigten folgende Zelllinien: RPMI 8226, INA-6, U266, JK6L, MM1.S, L363. Einige dieser Myelomlinien sollen anschließend in Zytotoxizitätstests verwendet werden.

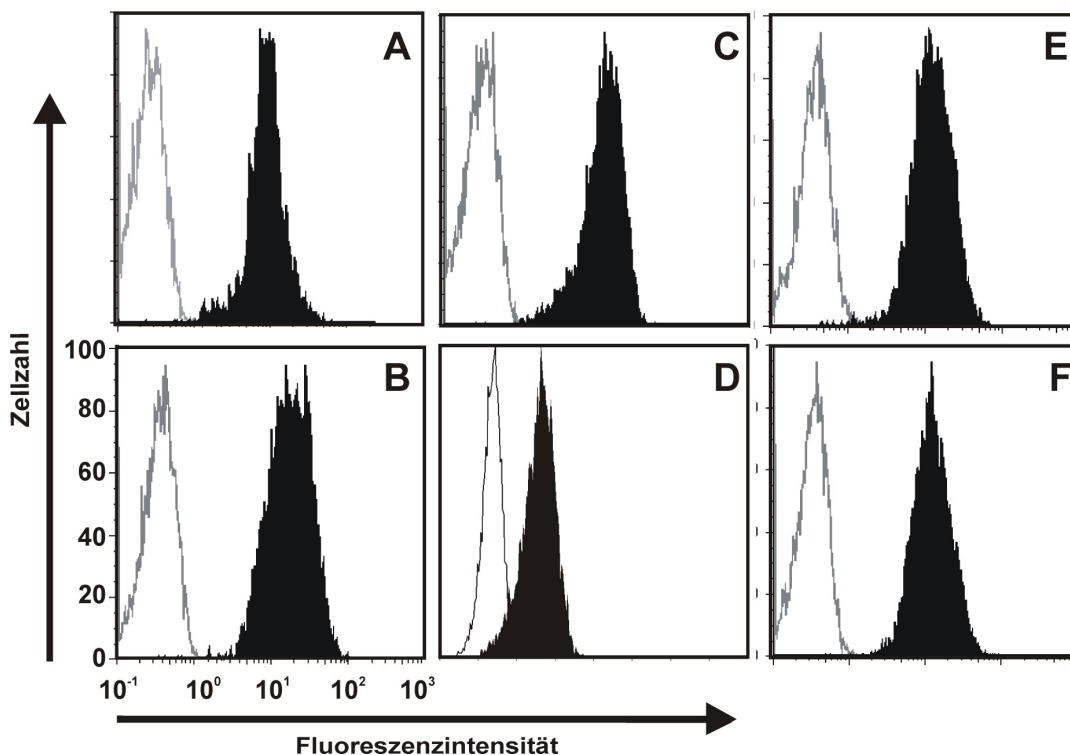


Abb. 21: Nachweis der Oberflächenexpression von HM1.24 auf verschiedenen Myelomlinien. Durchflußzytometrische Analysen der Bindung von HM1.24-Fc-FITC markierten Antikörper und einem irrelevanten Antikörper (Erbix-Fc-FITC) auf: (A) RPMI 8226, (B) U266, (C) INA-6, (D) JK6L, (E) MM1.S, (F) L363.

Schwarze Peaks repräsentieren das Signal, das mit HM1.24-Fc-FITC erhalten wurde; weiße Peaks mit einem irrelevanten Antikörper. Auf allen Myelomlinien ließ sich die Oberflächenexpression von HM1.24 nachweisen.

Im Anschluss wurde in Zytotoxizitätstests die durch den bsscFv vermittelte Lyse der Myelomzellen RPMI 8226 in Abhängigkeit der eingesetzten Antikörper-Konzentrationen untersucht. Das Effektor-zu-Zielzell Verhältnis betrug gleich bleibend 80:1. Der bsscFv und auch der monoklonale Antikörper zeigen mit steigender Konzentration eine höhere Lyserate der Myelomzellen. Dabei weist der bsscFv HM1.24xCD16 eine deutlich erhöhte Fähigkeit zur Tumorzelllyse im Vergleich zum monoklonalen HM1.24-IgG1 auf, bei gleichen molaren Konzentrationen. Maximale Lyseraten erreichte der bsscFv bei einer Konzentration von 1µg/ml (entspricht ca. 15nM), der monoklonale HM1.24-IgG1 scheint seine maximale Lyse bei einer Konzentration von 4µg/ml (entspricht ca 27nM) noch nicht erreicht zu haben. Dies verdeutlicht die höhere Effizienz des bsscFv HM1.24xCD16. Ein irrelevanter Antikörper zeigte keine Lyse der Myelomlinie.

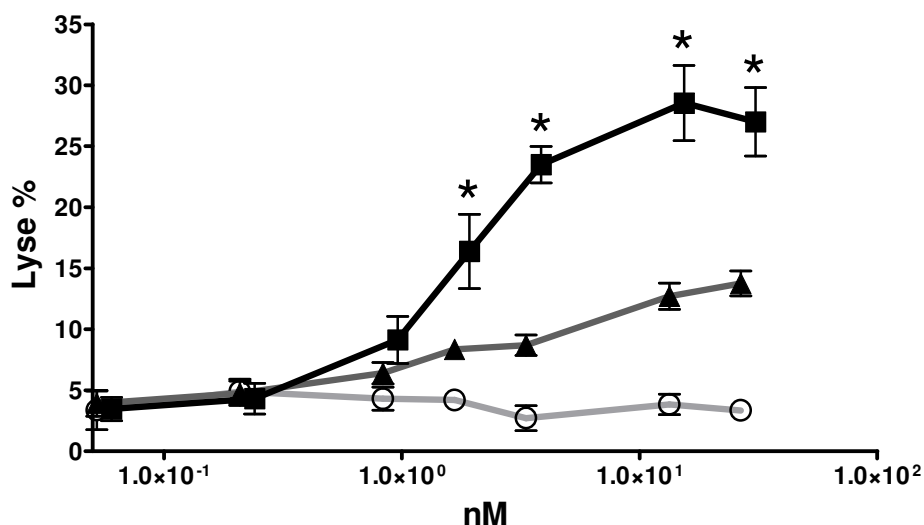


Abb. 22: Abhängigkeit der spezifischen Tumorzelllyse von RPMI 8226 von der Antikörperkonzentration. Der rekombinante bsscFv [HM1.24xCD16] und der monoklonale ChHM1.24 vermitteln spezifische Lyse von RPMI 8226 Zellen in ⁵¹Cr-Release-Experimenten mit frisch isolierten MNCs aus verschiedenen gesunden Spendern in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration der Antikörper bei gleich bleibenden E:T Verhältnis von 80:1. Die maximale Lyse des bsscFv liegt signifikant höher als die des monoklonalen Antikörpers HM1.24-IgG1 bei gleichen molaren Konzentrationen. Ein irrelevanter IgG1-Antikörper zeigt keine Lyse der Zielzellen. Signifikante Lyseraten mit einem Wert P<0,05 sind mit einem Stern (*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit Effektoren von verschiedenen gesunden Spendern.

○ Kontroll-IgG1; ▲ ChHM1.24; ■ HM1.24xCD16

Auch hier wurden entsprechende Blockade-Experimente mit CD16-Antikörpern sowie irrelevanten Antikörpern durchgeführt (siehe Abb. 23). In Zytotoxizitätstests ließ sich die bsscFv-vermittelte Lyse von Effektorzellen durch Zugabe von anti-CD16 Antikörpern im Überschuss blockieren. Somit kam es nicht zur Lyse der Zielzellen. Durch Zugabe eines irrelevanten Antikörpers, TH-69, ließ sich die Lyse der Myelomzellen nicht beeinflussen. Somit konnte auch hier bewiesen werden, dass die Tumorzelllyse über den bsscFv HM1.24xCD16 induziert wird.

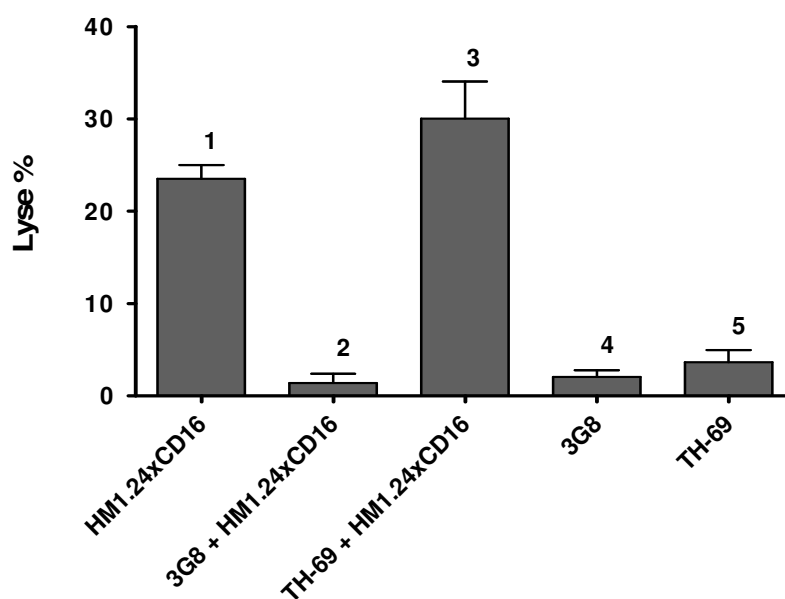


Abb. 23: Nachweis der spezifischen Lyse der Zielzellen RPMI 8226 durch den bsscFv [HM1.24xCD16]. Der rekombinante bsscFv wurde zum Nachweis seiner zellulären Zytotoxizität/Induktion der spezifischen Tumorzelllyse von RPMI 8226 Zellen in ^{51}Cr -Release-Experimenten mit frisch isolierten MNCs aus verschiedenen gesunden Spendern eingesetzt. (1) Spezifische Tumorzelllyse durch den bsscFv (0,25µg/ml). (2) Dem bsscFv wurde ein CD16-Antikörper (3G8) in Überschuss zugefügt (10µg/ml), die Tumorzelllyse wurde somit blockiert. (3) Dem bsscFv wurde ein unspezifischer Antikörper (TH-69; anti-CD7) zugefügt (10µg/ml), beeinflusst Lyse der Zielzellen nicht. (4) Alleiniger Einsatz von 3G8 (10µg/ml), vermittelt keine Tumorzelllyse. (5) Alleiniger Einsatz von TH-69 (10µg/ml), vermittelt keine Tumorzelllyse.

Weiterhin wurde die durch den bsscFv induzierte Lyse der Myelomlinien INA-6 und U266 untersucht (siehe Abb. 24). INA-6 ist eine von unserem Labor etablierte Linie, wobei dass besondere an INA-6 darin liegt, dass diese strikt von Interleukin-6 in ihrem Überleben abhängig ist. Das Effektor-zu-Zielzell Verhältnis betrug auch hier konstant 80:1. Die eingesetzte Konzentration des bsscFv betrug 1µg/ml, die der monoklonalen Antikörper 2µg/ml. Der bsscFv

HM1.24xCD16 sowie der monoklonale HM1.24-IgG1 zeigen Lyse mit allen getesteten Myelomlinien. Der bsscFv weist jedoch eine signifikant höhere Lyserate auf im Vergleich zum monoklonalen Antikörper bei gleicher molarer Konzentration. Bei dem Kontroll-Antikörper, Cetuximab ist keine Tumorzelllyse zu beobachten. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Myelomlinie U266 NK-Zell sensibel ist und eine Lyse dieser Myelomlinie nur bei Anwesenheit von NK-Zellen zu beobachten ist ohne Einsatz von Antikörpern.

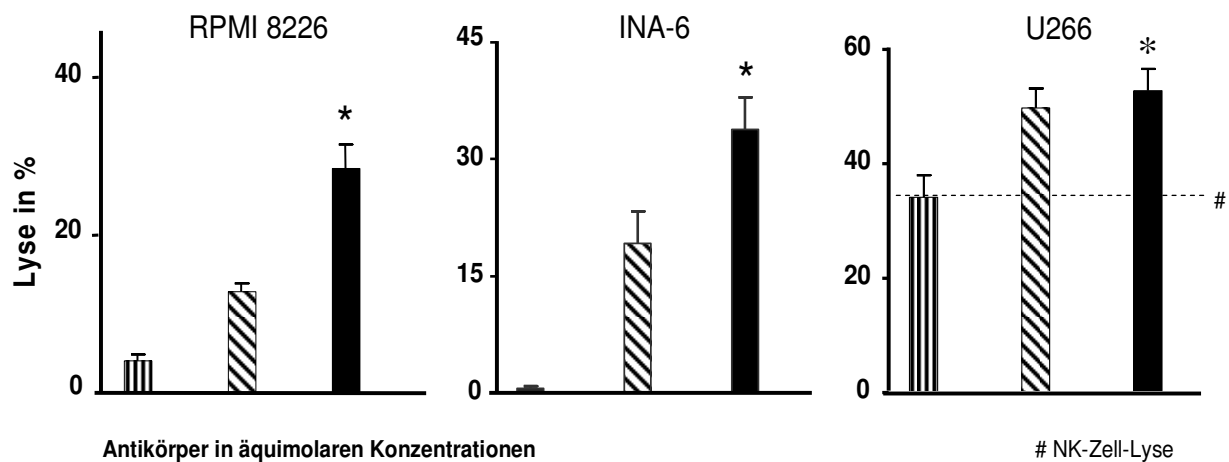


Abb. 24: Der rekombinante bsscFv [HM1.24xCD16] induziert Effektorzell-vermittelte Lyse verschiedener Myelomlinien. Die Zytotoxizität des bsscFv wurde mit der des monoklonalen HM1.24-IgG1 verglichen. Als Zielzellen wurden RPMI 8226, INA-6 und U266 in ^{51}Cr -Release Tests mit frisch isolierten MNCs als Effektoren in einem E:T Verhältnis von 80:1 verwendet. Sowohl der bsscFv (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) als auch der monoklonale HM1.24-IgG1 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) induzieren spezifische Lyse aller Myelomlinien. Der bsscFv weist dabei eine signifikant höhere Lyserate auf im Vergleich zum monoklonalen Antikörper bei gleicher molarer Konzentration. Ein Kontrollantikörper zeigt keine Lyse der Zielzelle. Die Myelomlinie U266 ist NK-Zell sensibel und somit ist schon Lyse dieser Zellen nur bei Anwesenheit von NK-Zellen zu beobachten, ohne Einsatz von Antikörpern. Signifikante Unterschiede der Lyse durch den bsscFv gegen den monoklonalen Antikörper mit einem Wert $P < 0,05$ sind mit einem Stern (*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit MNCs von verschiedenen gesunden Spendern.

▨ Kontroll-IgG1; ▨ HM1.24-IgG1; ■ HM1.24xCD16

3.5.2 Zytotoxische Aktivität des bsscFv [HM1.24xCD16] gegenüber primären humanen Tumorzellen

Der bsscFv [HM1.24xCD16] zeigte bereits zytotoxisches Potential an verschiedenen Myelomzelllinien und an der B-Zell-Linie ARH-77. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob der bsscFv spezifische Lyse an primären humanen Tumorzellen induzieren kann. Primäre Tumorzellen sind häufig schwieriger zu lysieren als etablierte Zelllinien. Der bsscFv wurde dazu in ADCC-Reaktionen mit MNCs als Effektoren an frisch isolierten CD38- und CD138-doppelt-positiven Plasmazellleukämie-Zellen getestet, die aus dem peripheren Blut isoliert wurden.

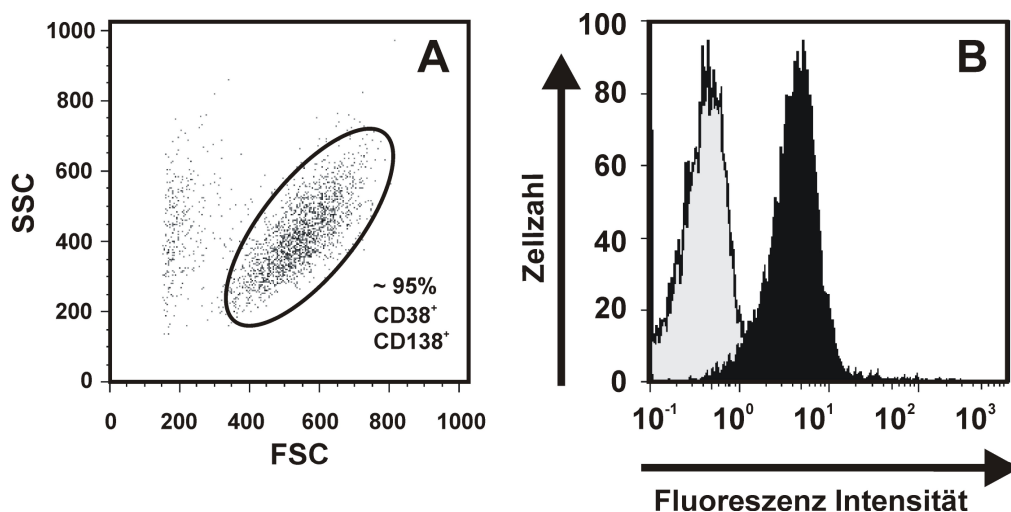


Abb. 25: Primären CD38/CD138-positive Plasmazellleukämie-Zellen zeigen in Immunfluoreszenzanalysen Expression von HM1.24 auf der Zelloberfläche. (A) Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut eines Plasmazellleukämie-Patienten wurden in Immunfluoreszenzanalysen auf CD38- und CD138-Positivität mittels gegen CD38- und CD138-gerichteter Antikörper untersucht und wiesen einen über 95%igen Tumoranteil auf. (B). In durchflusszytometrischen Analysen wurde den primären Tumorzellen gegen HM1.24-gerichtete Antikörper zugegeben. Die primären Plasmazellleukämie-Zellen zeigen eine Expression von HM1.24 auf ihrer Zelloberfläche.

Zunächst wurden die mononukleären Zellen aus dem Blut des Tumorpatienten über Percoll isoliert. Die Reinheit der Proben wurde durch CD38- und CD138-Färbung in Immunfluoreszenzanalysen überprüft. Die isolierten Zellen waren zu mehr als 95% CD38- sowie CD138-positiv. In ADCC-Reaktionen vermittelte der bsscFv [HM1.24xCD16] spezifische Lyse der Tumorzellen mit frisch isolierten MNCs als Effektorzellen aus drei verschiedenen gesunden

Spendern. Als Vergleich wurde der entsprechende humanisierte HM1.24-IgG1 Antikörper mitgeführt, von dem bereits bekannt war, dass dieser NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen induziert (Ono, Ohtomo et al. 1999; Ozaki, Kosaka et al. 1999). Als Kontrolle diente ein irrelevanter IgG1-Antikörper. Das Effektor-zu-Target-Verhältnis betrug 80:1. Obwohl die unterschiedlichen Donorzellen verschieden hohe Lyseraten der Tumorzellen hervorriefen, vermittelten die MNCs von jedem Donor in Gegenwart des bsscFv und des humanisierten IgG1-Antikörpers signifikant erhöhte Lyse. Im direkten Vergleich zeigte der bsscFv [HM1.24xCD16] eine höhere spezifische Lyse der Tumorzellen als der humanisierte HM1.24 IgG1-Antikörper. Ein irrelevanter Antikörper vermittelt keine Lyse der Tumorzellen.

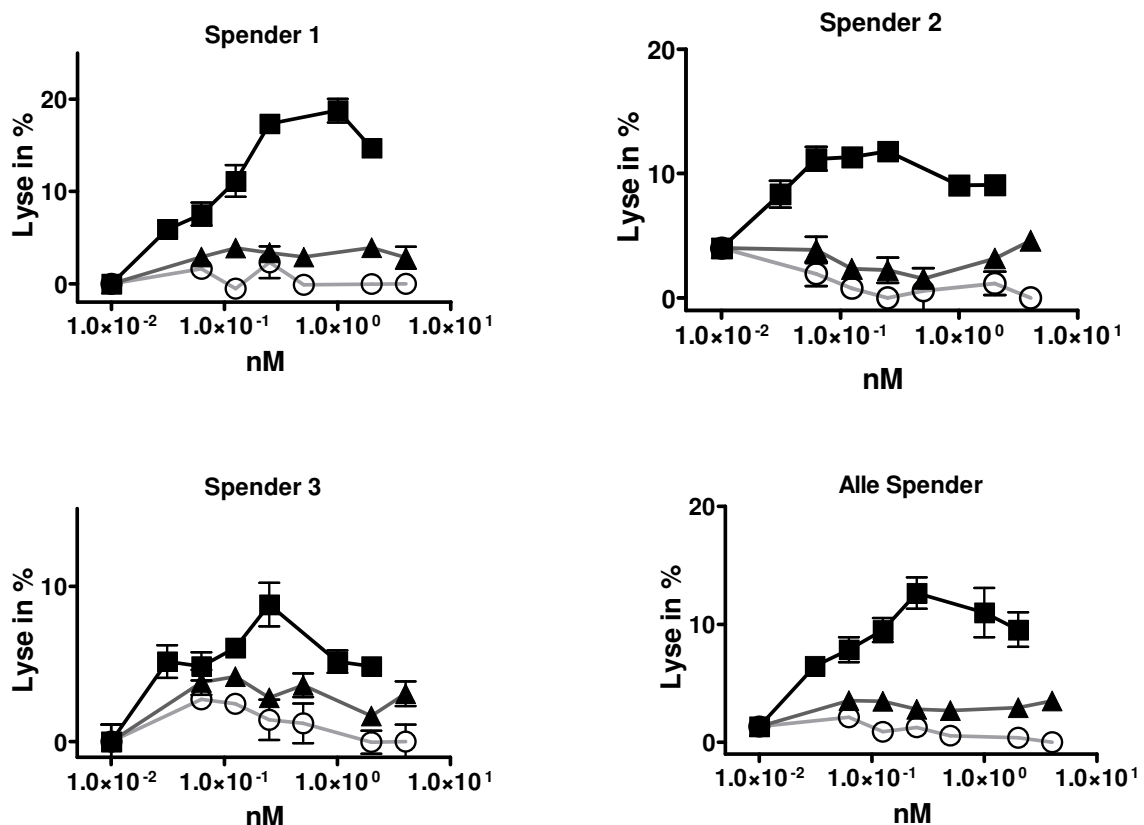


Abb. 26: Zytotoxische Aktivität des bsscFv [HM1.24xCD16] gegen primäre humane CD38/CD138-positive Myelomzellen im Vergleich zu dem monoklonalen HM1.24-IgG1. Kryokonservierte CD38/CD138-positive humane Myelomzellen aus Blut eines Tumorpatienten wurden als Zielzellen für ^{51}Cr -Release-Experimente mit MNC als Effektoren aus 3 verschiedenen gesunden Spendern in Abhängigkeit der eingesetzten Antikörperkonzentrationen bei einem E:T Verhältnis von 80:1 eingesetzt. Die maximale Lyse des bsscFv liegt signifikant höher als die des monoklonalen Antikörpers HM1.24-IgG1 bei gleichen molaren Konzentrationen. Ein irrelevanter IgG1-Antikörper zeigt keine Lyse der Zielzellen.

In entsprechend durchgeführten Kontrollexperimenten wurde dem bsscFv zum einen CD16-Antikörper im Überschuss zugefügt und zum anderen ein unspezifischer Antikörper (siehe Abb. 27). Auch hier lässt sich die Lyse der Tumorzellen durch CD16-Antikörper blockieren, während die Lyse der Tumorzellen durch den bsscFv nach Zugabe eines irrelevanten Antikörper nicht beeinflusst wird.

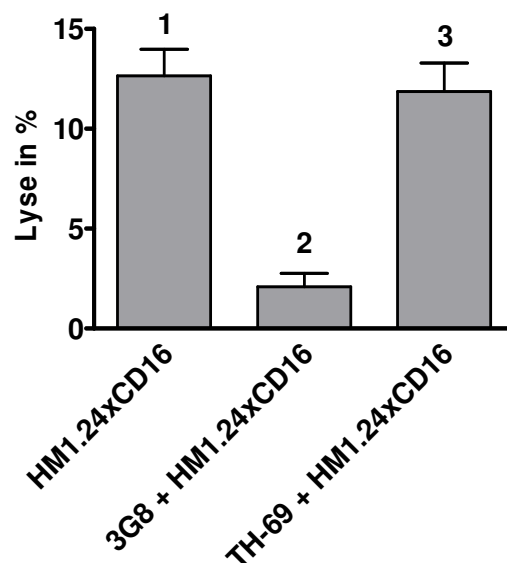


Abb. 27: Nachweis der spezifischen Lyse der primären humanen Tumorzellen durch den bsscFv [HM1.24xCD16]. Der rekombinante bsscFv wurde zum Nachweis seiner Induktion der spezifischen Tumorzelllyse von primären humanen Myelomzellen in ⁵¹Cr-Release-Experimenten mit frisch isolierten MNCs aus verschiedenen gesunden Spendern eingesetzt. (1) Spezifische Tumorzelllyse durch den bsscFv (0,25µg/ml). (2) Dem bsscFv wurde ein CD16-Antikörper (3G8) in Überschuss zugefügt (10µg/ml), die Tumorzelllyse wurde somit blockiert. (3) Dem bsscFv wurde ein unspezifischer Antikörper (TH-69; anti-CD7) zugefügt (10µg/ml), beeinflusst Lyse der Zielzellen nicht.

Signifikante Lyseraten mit einem Wert $P < 0,05$ sind mit einem Stern (*) markiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten mit MNCs von verschiedenen gesunden Spendern.

Es wurde gezeigt, dass der rekombinante bsscFv HM1.24xCD16 NK-Zellen effizient an Myelomzellen rekrutiert und durch zelluläre Zytotoxizität Tumorzelllyse induziert. Durch spezifische Bindung an seine Zielantige, HM1.24 auf Myelomzellen, und CD16 auf Effektorzellen, bringt er diese in räumliche Nähe. Die gezielte Rekrutierung von NK-Zellen über aktivierenden FcγRIII (CD16) ermöglicht eine effizientere Tumorzelllyse durch den bsscFv im Vergleich zum monoklonalen HM1.24-IgG1.

4 DISKUSSION

Durch den Einsatz von Chemotherapeutika und Stammzelltransplantationen konnten bei der Behandlung des Multiplen Myeloms deutliche Erfolge erzielt werden und die mediane Überlebenszeit von betroffenen Patienten erhöht werden. In mehr Patienten konnte eine komplette Remission erzielt werden, was aber immer noch keine Heilung bedeutet. Das Multiple Myelom gilt weiterhin als eine unheilbare Erkrankung, wenn gleich bei immer mehr Patienten eine komplette Remission erwartet werden kann. Für die Behandlung des Multiplen Myeloms besteht daher dringender Bedarf an der Entwicklung neuer Therapiekonzepte, welche die bisherigen Behandlungsmöglichkeiten erweitern. Ziel ist es, die Myelomzellen gezielt anzugreifen. Ein Ansatz ist der Einsatz von Antikörpern, welche im Gegensatz zu den meisten Therapeutika durch ihre hohe Antigenspezifität in der Lage sind, gezielt einzelne Zellpopulationen des Organismus anzugreifen. Dennoch kann, durch die Entwicklung von bispezifischen Antikörpern, die therapeutische Effizienz von konventionellen monoklonalen Antikörpern verbessert werden. Dadurch lässt sich möglicherweise aufgrund der Größe eine verbesserte Penetration ins Tumorgewebe erzielen oder die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern verhindern. Ebenso ist eine gezielte Rekrutierung von Effektorzellen mit aktivierenden Fc-Rezeptoren ohne Bindung an inhibitorische Fc-Rezeptoren möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bispezifischer single-chain Fv-Antikörper charakterisiert für den gezielten Einsatz zur Rekrutierung von Effektorzellen und Induktion lytischer Prozesse gegen Myelomzellen. ScFv-Fragmente gegen CD16 und HM1.24 dienten als Basisstrukturen. Durch die genetische Fusion zweier scFv-Fragmente wurde ein bispezifischer scFv-Antikörper mit zwei unterschiedlichen Bindungsspezifitäten entwickelt. Dabei war eine gegen ein Tumor-assoziiertes Antigen auf Myelomzellen, HM1.24, und die andere gegen CD16 (Fc γ RIII), ein aktivierendes Oberflächenmolekül auf NK-Zellen, gerichtet. Das zytotoxische Potential des bsscFv HM1.24xCD16 wurde durch ADCC-Reaktionen *in vitro* sowohl an Zelllinien, als auch an primärem humanen Tumormaterial nachgewiesen.

4.1 HM1.24 als geeignetes Zielmolekül

4.1.1 Expressions-Profil

Da für Myelomzellen nur wenig geeignete Zielmoleküle definiert wurden, spielen Antikörper bei der Therapie des Multiplen Myeloms bisher eine untergeordnete Rolle. Antikörper gegen CD38, CD138, CD74, CD40 und weitere, befinden sich derzeit in präklinischen und klinischen Studien. Jedoch wird ein Großteil dieser Antigene nicht nur auf Myelomzellen exprimiert, sondern auch auf normalem Gewebe sowie auf hämatopoetischen Zellen. HM1.24 ist ebenfalls als Antigen definiert, welches auf terminal differenzierten B-Zellen hochexprimiert wird und auf Myelomzellen überexprimiert wird. HM1.24, Synonym BST-2, wurde als erstes auf Stromazellen des Knochenmarks beschrieben, welche das Wachstum und die Entwicklung von B-Zellen regulieren (Ishikawa, Kaisho et al. 1995). In der Literatur wird kontrovers über die Expression von HM1.24 auf normalen Geweben und Blutzellen diskutiert. So wird einerseits beschrieben, dass HM1.24 nicht bzw. nur sehr gering auf normalen Geweben einschließlich peripheres Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Leber, Niere, Herz, Milz und hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Goto, Kennel et al. 1994; Ozaki, Kosaka et al. 1999). Auf der anderen Seite wird eine Expression auf Geweben, wie Leber, Gehirn, Hoden, Milz, Skelettmuskel, Lunge, Niere und Herz, beschrieben (Kupzig, Korolchuk et al. 2003). Allerdings wurden diese Untersuchungen mit dem homologen Ratten-Protein durchgeführt und es ist somit fraglich, inwiefern diese Ergebnisse auf humanes Gewebe zutreffen, da sich die Expressionsprofile von Ratten und Menschen unterscheiden. Auch auf normalen Lymphozyten und Monozyten wurde eine Expression von HM1.24 beschrieben.

Eine in unserem Labor durchgeführte Immunfluoreszenzanalyse von Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems zeigte, dass HM1.24 auf einen Teil der B-Zell-Population sowie auf Monozyten exprimiert wird. Alle anderen Blutzellen zeigten keine Expression von HM1.24 auf ihrer Zelloberfläche. Eine Überexpression von HM1.24 auf verschiedenen Myelomzelllinien sowie auf Tumorzellen von an Myelom erkrankten Patienten, konnte ebenfalls in Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine positive Korrelation zwischen ADCC und dem Expressionslevel des Antigens besteht, d.h. die Effizienz eines HM1.24-Antikörpers ist von der Menge der HM1.24-Antigene auf Zielzellen abhängig (Kawai, Koishihara et al. 2006).

4.1.2 HM1.24-Antikörper Therapie

In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der humanisierte monoklonale HM1.24 Antikörper den Zelltod von Myelomzellen *in vivo* mittels ADCC induziert (Ono, Ohtomo et al. 1999). Die Antitumoraktivität wird vermittelt über Effektorzellen (NK-Zellen, Monozyten, Makrophagen). Ein monoklonaler HM1.24 Antikörper führte zur Wachstumsinhibierung und IgG-Sekretion von humanen Myelomzellen in SCID-Maus-Modellen (Ozaki, Kosaka et al. 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein humanisierter HM1.24 Antikörper das Tumorstadium in humanen MM Xenograft Modells inhibiert, es zu einer Senkung des M-Proteins im Serum führt und das Überleben von den entsprechend mit Myelomzellen geimpften Mäusen verlängert. Die Antitumoraktivität von HM1.24-Antikörper gegen Myelomzellen wurde durch Vorbehandlung der Mäuse mit anti-Fcγ RezeptorII/III Antikörper vermindert, was zu dem Schluss führte, dass Effektorzellfunktionen für die Antitumoraktivität durch HM1.24 Antikörper *in vivo* benötigt werden (Kawai, Yoshimura et al. 2006). Antikörper-abhängige Zytotoxizität hängt also von der zytolytischen Aktivität Fc-Rezeptor-tragender Effektorzellen ab. Ebenfalls wurde gezeigt, dass ein humanisierter monoklonaler HM1.24 Antikörper ADCC vermittelt gegen Myelomzellen von Patienten, wobei die peripheren mononukleären Blutzellen aus unbehandelten Myelompatienten genauso effizient waren, wie die aus gesunden Spendern (Ozaki, Kosaka et al. 1999). Die ADCC-Aktivität ließ sich in Patienten mit verringerter ADCC-Aktivität durch Stimulation mit IL-2, IL-12, oder IL-15 steigern (Ozaki, Kosaka et al. 1999). Trotz der Erwartung der verringerten Funktion von NK-Zellen in Tumorpatienten, wurde eine gesteigerte Anzahl und erhöhte Aktivität von NK-Zellen beobachtet, sowohl im peripheren Blut als auch im Knochenmark (Ozaki, Kosaka et al. 1999). Diese Zellen können demnach als Effektorzellen agieren, um die mit dem Antikörper opsonierten Zielzellen zu lysieren.

Untersuchungen zeigten, dass NK-Zellen und LAK (*lymphokine-activated killer*)-Zellen in peripheren Blutstammzell-Transplantaten vorhanden sind und somit für die Tumoreradikation

nach Stammzelltransplantation zur Verfügung stehen (Neubauer, Benyunes et al. 1994; Silva, Parreira et al. 1995), während andere Zellen des hämatopoetischen Systems, wie B-Lymphozyten, erst nach Wochen bis Monaten im Blut nachweisbar sind. Somit stellen Antikörper, die Effektorzellen, wie NK-Zellen, rekrutieren, eine geeignete Therapieoption nach Stammzelltransplantation zur Eradikation der minimalen Resterkrankung dar (Ozaki, Kosaka et al. 1999). Dabei würde die Wirkung auf HM1.24-positiven B-Lymphozyten unwesentlich bleiben.

Derzeit befindet sich ein humanisierter monoklonaler HM1.24 Antikörper in klinischen Studien (Phase1). Dabei konnte gezeigt werden, dass der Antikörper keine lebenslimitierende Toxizität vermittelt (Bargou, Leo et al, 2008).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass HM1.24 ein potentiell Zielantigen auf Myelomzellen darstellt und dass HM1.24 Antikörper das Potential neuer therapeutischer Strategien besitzen.

4.2 CD16 als Antigen auf Effektorzellen/NK-Zellen

Die Stammzelltransplantation ist heute bei jüngeren Patienten die Methode der Wahl bei der initialen Behandlung des Multiplen Myeloms. Dabei können komplette Remissionsraten von ca. 40-50% (Einsele and Straka 2004) erreicht werden. Jedoch stellen Rezidive nach Transplantation mit hämatopoetischen Stammzellen ein schwerwiegendes Problem dar (Handgretinger, Klingebiel et al. 2003). Eine Verlängerung der progressionsfreien Zeit bzw. eine Langzeitremission kann nur durch eine Eliminierung einer minimalen Resterkrankung erreicht werden. Die ersten Monate nach Stammzelltransplantation öffnen hierzu möglicherweise ein Zeitfenster. Frühe transplantat-abgeleitete Immuneffektorzellen sind neben den Granulozyten die NK-Zellen, während die Rekonstitution von T- und B-Zellen erst nach mehreren Wochen oder Monaten einsetzt (Eyrich, Lang et al. 2001; Lang, Barbin et al. 2004). Somit stehen T-Zellen für eine Antikörpertherapie in dieser Phase nicht zur Verfügung. Natürliche Killerzellen stellen eine potente Untergruppe der Lymphozyten dar, um Tumorzellen anzugreifen und zu lysieren. Im Gegensatz zu T-Lymphozyten benötigen sie keine weiteren Kostimulatoren oder Voraktivierungen zum zytolytischen Angriff von Zielantigenen. Sie stellen somit in der frühen Posttransplantationsphase eine geeignete Effektorzellpopulation dar.

Die effektive Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen wird über den CD16a (FcγRIIIa)-Rezeptor gesteuert, welcher auf der Oberfläche von NK-Zellen und Makrophagen exprimiert wird (Gessner, Heiken et al. 1998). Neutrophile Granulozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche den GPI-verankerten CD16b (FcγRIIIb), welcher Phagozytose vermittelt. Der bispezifische scFv-Antikörper kann nicht zwischen diesen beiden Varianten unterscheiden. So müsste das optimale Antikörperkonstrukt lediglich CD16a erkennen können. Die zytolytische Aktivität des CD16-gerichteten bispezifischen scFv-Antikörpers könnte *in vivo* reduziert sein, da CD16 in größeren Mengen über Proteolyse von der Oberfläche der Neutrophilen als lösliches CD16 ins Blut abgegeben wird (Koene, de Haas et al. 1996). Untersuchungen belegen jedoch, dass die durch bispezifische Antikörper vermittelte Zytotoxizität nicht durch Interaktionen mit CD16-tragenden Neutrophilen vermindert wird (Weiner, Alpaugh et al. 1996). Weiterhin konnte bei dem in vorklinischen und klinischen Versuchen befindlichen bispezifischen Antikörper [CD30xCD16] in Patienten mit refraktärem Hodgkin-Lymphom beobachtet werden, dass die zytolytische Aktivität *in vivo* nicht durch die Kompetition mit CD16b auf Neutrophilen reduziert zu sein scheint (Hartmann, Renner et al. 1996; Hartmann, Renner et al. 2001).

4.2.1 Weitere Effektorzellpopulationen

In vitro sind neben NK-Zellen auch verschiedene andere Effektorzellpopulationen, wie neutrophile Granulozyten, fähig, eine Tumorzelllyse durch Antikörper zu induzieren. Neutrophile Granulozyten stellen zahlenmäßig im Organismus eine weitaus größere Effektorzellpopulation dar als NK-Zellen. Im humanen System wurde jedoch gezeigt, dass IgG1-Antikörper in der Regel nur sehr ineffiziente Lyse durch unstimulierte Granulozyten über die Rekrutierung von CD32a (FcγRIIa) vermitteln. Eine effiziente Lyse von Tumorzellen durch Granulozyten wird über die Aktivierung des myeloischen IgA-Rezeptors, CD89, vermittelt (Dechant, Vidarsson et al. 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass NK-Zellen über den rekombinanten bispezifische scFv [HM1.24xCD16] zu Tumorzellen rekrutiert werden und somit die Zytolyse maligner Myelomzellen induziert werden kann. So zeigten in bereits vorher durchgeführten Versuchen sogar Effektorzellen von Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen (Bruenke, Barbin et al. 2005). Somit stellen NK-Zellen eine

potente Effektorzellpopulation in der Posttransplantationsphase für die Antikörper-basierte Therapie von MRD dar.

4.3 Bispezifische Antikörper

Die Antikörpertherapie hat sich in den letzten Jahren zu einer weiteren bedeutenden Therapieoption zur Behandlung von Tumorpatienten entwickelt. Bei den bisher in der Klinik eingesetzten Antikörpern handelt es sich meist um IgG1-Antikörper, wie auch der in klinischen Studien befindliche Antikörper gegen HM1.24, da IgG1-Antikörper ADCC durch mononukleäre Effektorzellen induzieren, Komplementsystem aktivieren und eine ausreichende Plasmahalbwertszeit besitzen. Trotz der beschriebenen Erfolge, ist die therapeutische Effizienz dieser IgG1-Antikörper begrenzt.

Konventionelle monoklonale Antikörper interagieren über ihren Fc-Teil mit verschiedenen anderen Komponenten des Immunsystems. Eine Verbesserung der Effektorzellrekrutierung kann durch *Fc-Engineering* sowie durch Verwendung bispezifischer Antikörper erreicht werden. Somit können unerwünschten Interaktionen von Fc-Teilen monoklonaler IgG1-Antikörper auf ein Minimum reduziert werden.

Ziel des Fc-Engineering ist es, die Affinität des Fc-Anteils therapeutischer Antikörper zu aktivierenden Fc-Rezeptoren zu steigern und gleichzeitig die Bindungsstärke an inhibierende Fc-Rezeptoren zu verringern. Dabei werden derzeit zwei Strategien verfolgt. Zum einen wird das Proteinrückrat im Fc-Teil modifiziert, zum anderen wird die Fc-gebundene Glykosylierung verändert (Peipp et al. 2007; Shields, Namenuk et al. 2001; Shields, Lai et al. 2002; Shinkawa, Nakamura et al. 2003; Lazar, Dang et al. 2006). *In vitro* zeigten beide Ansätze stark verbesserte lytische Aktivität, der klinische Beweis steht noch aus. Eine Limitierung beider Strategien liegt jedoch darin, dass der Fc-Anteil des modifizierten Antikörpers mit verschiedenen Fc-Rezeptoren Wechselwirkungen zeigen kann. Des Weiteren ist es problematisch, gezielt die Affinität für einzelne Fc-Rezeptoren zu verändern (Shields, Namenuk et al. 2001; Lazar, Dang et al. 2006).

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Effektorzellrekrutierung bieten bispezifische Antikörper. Durch gezieltes Ansteuern von Oberflächenmolekülen auf Effektorzellen können

Wechselwirkungen mit nicht-aktivierenden oder inhibierenden Fc-Rezeptoren unterbunden werden. Somit ist durch die Verwendung bispezifischer Antikörper gegen entsprechende Triggermoleküle auf Effektorzellen eine potentere Antitumoraktivität zu erwarten. Ebenso können Effektorzellen des Immunsystems rekrutiert werden, die keine Fc-Rezeptoren tragen wie beispielsweise T-Zellen und somit zur Lyse von Tumorzellen herangezogen werden (Segal, Weiner et al. 1999). Als Basisstruktur für solche rekombinanten bispezifischen Antikörper dienen meist Fab-Fragmente. Für die klinische Verwendung sollten bispezifische Antikörper folgende Anforderungen erfüllen: Zum einen sollte eine Immunantwort gegen den therapeutischen Antikörper vermieden werden. Weiterhin sollten bispezifische Antikörper, nach Bindung der Zielzelle, monovalent an Effektorzellen binden und somit eine Aktivierung der Effektorzellen induzieren. Fc-Rezeptor vermittelte Nebeneffekte wie Zytokin-Ausschüttung, Thrombozytopenie und Leukozytopenie sollten vermieden werden. Darüber hinaus sollten bispezifische Antikörper eine Größe haben, die es ihnen erlaubt ins Tumorgewebe einzudringen und ausreichend im Körper zirkulieren zu können um ihre therapeutischen Effekte zu vermitteln.

Rekombinante bispezifische Antikörper wurden bereits *in vitro* und *in vivo* untersucht. Daten verschiedener *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigen, dass bispezifische Antikörper Potential bieten, die therapeutische Effizienz von Antikörpern zu verbessern. Grund dafür ist vor allem eine effizientere Rekrutierung von Effektorzellen. Bei dem sich bereits in der klinischen Phase befindlichen Antikörper gegen HM1.24 handelt es sich um IgG1-Antikörper. Im direkten Vergleich *in vitro* zeigte der bispezifische scFv [HM1.24xCD16] eine höhere Lyserate von Myelomzellen durch gezielte Rekrutierung von MNCs als Effektorzellen. Durch die Verwendung hochspezifischer bsscFv-Antikörper gegen die entsprechenden Triggermoleküle auf Effektorzellen, kann die Antitumoraktivität gesteigert werden, da der bsscFv-Antikörper mit hoher Affinität an den aktivierenden FcγRIII-Rezeptor bindet.

4.3.1 Pharmakokinetik bispezifischer Antikörper

Bispezifische Antikörper waren *in vitro* häufig monoklonalen Antikörpern bei der Vermittlung von ADCC überlegen, dennoch zeigen sich in der klinischen Anwendung der bispezifischen Antikörper Limitierungen (Repp, van Ojik et al. 2003). Die Retentionszeit im Blut spielt für die therapeutische Effizienz eines Antikörperkonstruktes *in vivo* eine wichtige Rolle. Die Retention

wird beeinflusst durch proteolytischen Abbau sowie durch Extravasation und Ausscheidung über die Niere. Da rekombinante bispezifische scFv-Antikörper kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von ca 55-60 kDa sind, besteht nur eine sehr kurze Verweildauer im Organismus. Die initiale Halbwertszeit liegt unter 30 Minuten (Kontermann 2005). Diese Halbwertszeit liegt damit deutlich unter der ganzer Antikörper-Moleküle, welche bis zu einigen Wochen im Blut zirkulieren aufgrund des hohen Molekulargewichtes und FcRn-Rezeptor vermittelten Recyclings (Kontermann 2005). Eine Möglichkeit zur Verlängerung der Retentionszeit im Blut ist die Erhöhung des Molekulargewichtes durch Anheften von Polyethylenglycol (PEG). So wurden bei klinischen Versuchen verschiedene pegylierte Fab-Fragmente mit ihren nicht pygeliierten Formen verglichen, wobei die PEG angehefteten Fab-Fragmente eine höhere Zirkulationszeit im Blut und eine verbesserte therapeutische Effizienz aufwiesen (Harris and Chess 2003). Eine andere Möglichkeit zur Erhöhung der Halbwertszeit im Blut ist die genetische Anheftung von humanem Serumalbumin an den bispezifischen scFv-Antikörper. In diesen Antikörperkonstrukten ist zwischen beiden scFv-Leseköpfen das humane Serumalbumin-Protein eingesetzt, wodurch das Molekulargewicht erhöht wird und damit die renale Ausscheidung deutlich reduziert werden kann (Chester, Pedley et al. 2004; Muller, Karle et al. 2007). Weiterhin können Moleküle im sogenannten Tribody-Format generiert werden, die ein Molekulargewicht von 100-120 kDa aufweisen und somit im Vergleich zu bsscFvs vermutlich weniger stark über die Niere ausgeschieden werden und damit länger in der Zirkulation bleiben. Tribodies sind Konstrukte, die eine bivalente Bindung an der Zielzelle und eine monovalente Bindung an der Effektorzelle aufweisen (Schoonjans, Willems et al. 2000; Schoonjans, Willems et al. 2001; Mertens, Devos et al. 2004). Ein weiteres Format bispezifischer Antikörper ist die Herstellung von „*knobs-into-holes*“-Antikörpern durch Heterodimersation von zwei unterschiedlichen schweren Ketten (Ridgway, Presta et al. 1996).

Derzeit befindet sich ein bispezifischer scFv, gerichtet gegen CD19 und CD3 (Blinatumomab), für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen in klinischen Studien. Es konnte gezeigt werden, dass dieser zu einer Tumorregression führt und dabei eine höhere Potenz aufweist als ein konventioneller monoklonaler Antikörper gegen CD19 (Bargou, Leo et al. 2008). Die Gabe des bispezifischen Antikörpers erfolgte per Dauerinfusion, eine weitere Möglichkeit der Applikation eines bispezifischen scFv. Bisher wurde keine dosislimitierende Toxizität beobachtet.

4.4 Immunogenität

Die Immunogenität in Patienten stellt ein weiteres Problem der Antikörper-basierten Therapeutika dar. In klinischen Studien untersuchte murine Antikörper führen in der Vielzahl der Patienten zu einer Aktivierung des Immunsystems und damit zur Bildung von „*human anti mouse antibody*“ (HAMA)-Antikörpern (Schroff, Foon et al. 1985; Shawler, Bartholomew et al. 1985). Durch die gegen die therapeutischen Antikörper gerichtete Immunantwort war die wiederholte Anwendung des Therapeutikums in vielen Fällen nicht möglich und die Effizienz reduziert (Khazaeli, Conry et al. 1994). Die Hauptepitope, die für eine Immunreaktion gegen die Immunglobuline verantwortlich sind, liegen überwiegend in den konstanten Regionen eines Antikörpers (Jaffers, Fuller et al. 1986; Thorpe, Turner et al. 2003). Durch Chimärisierung und Humanisierung von Antikörpern wurden Moleküle generiert, die eine deutlich geringere Immunantwort zeigten (Boulianne, Hozumi et al. 1984; Morrison, Johnson et al. 1984). Der in dieser Arbeit verwendete bsscFv-Antikörper wurde aus V-Regionen hergestellt, die murinen Ursprungs sind. Somit stellt sich hier die Frage, ob der bsscFv-Antikörper eine gegen ihn gerichtete Immunantwort in Patienten induziert. ScFv Antikörper bestehen aus den variablen Regionen der leichten und schweren Kette. Da die konstanten Regionen fehlen, sollte ein Großteil der potentiell immunogenen Epitope nicht mehr im Molekül enthalten sein. Darüber hinaus wurden einige Antikörper zusätzlich in den V-Regionen humanisiert, um in den variablen Regionen gelegene immunogene Epitope zu eliminieren und dadurch bei Einsatz von therapeutischen Antikörpern einer möglichen Immunantwort vorzubeugen (Rebello, Hale et al. 1999; Tan, Mitchell et al. 2002). Ob die Verwendung humanisierter V-Regionen gegenüber muriner V-Regionen in Antikörper-Konstrukten einen weiteren Vorteil bringt, wird derzeit kontrovers diskutiert. So traten bei der Behandlung von Patienten mit dem chimärisierten Antikörper Rituximab auch nach wiederholter Applikation in nur 1% der Fälle eine Immunreaktion gegen den therapeutischen Antikörper auf (Press 1999). Im Gegensatz dazu wurde bei einem Großteil der Patienten, die mit dem humanisierten CD52-Antikörper, CAMPATH-1H, behandelt wurden, humane anti-human Antikörper (HAHA; *human anti-humanized antibodies*) (Ritter, Cohen et al. 2001) festgestellt. Bei dem Vergleich der humanisierten und chimären Form eines anti-TNF α Antikörpers wurden in 10% der Fälle Immunreaktionen durch Bildung von HAMA's gegen den chimären Antikörper und in 7% der Fälle gegen die humanisierte Variante

festgestellt (Sandborn, Feagan et al. 2001). Weitere Beobachtungen legen nahe, dass neben den murinen Anteilen der Antikörper auch andere Parameter wie Eigenschaften des Zielantigens, Krankheitsstadium, Dosis, Schema der Verabreichung, Status der Immunsuppression im Patienten, Fähigkeit des Antikörpers zur Immunmodulation oder Immunsuppression, die Entstehung einer Immunantwort beeinflussen (Clark 2000; Glennie and Johnson 2000). Ob die Humanisierung der V-Regionen von Antikörpern entscheidend zur Vermeidung einer potentiellen Immunantwort gegen das therapeutische Immunglobulin beiträgt, bleibt bei der derzeitigen Datenlage fraglich.

Durch die Entwicklung neuer Techniken ist es heutzutage möglich, komplett humane Antikörper herzustellen. Dazu zählen humane *Phage-Display*-Banken (Vaughan, Williams et al. 1996), die Immunisierung von Mäusen, die mit humanen PBLs (*peripheral blood leukocytes*) rekonstituiert wurden (Lubin, Segall et al. 1994), und der Einsatz transgener Mäuse, die als Transgene große Bereiche der humanen Immunglobulin Loci tragen (Lonberg and Huszar 1995; Vaughan, Osbourn et al. 1998). Die auf diese Weise hergestellten Antikörper oder Antikörperfragmente besitzen vollständig humane Sequenzen. Jedoch müssen auch in diesem Fall die V-Regionen hypermutiert werden, um hochaffine Antikörper zu isolieren (Clark 2000).

Der Einsatz muriner V-Regionen in therapeutischen Antikörper-Konstrukten kann Probleme mit sich bringen, jedoch muß dies, wie im Fall mit Rituximab, nicht zwingenderweise der Fall sein. Es ist davon auszugehen, dass der Trend für die Entwicklung neuer Antikörper-basierter Therapeutika zu humanisierten oder komplett humanen Antikörperkonstrukten gehen wird, da weniger Komplikationen zu erwarten sind als bei murinen Antikörpern.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit ein bispezifischer scFv-Antikörper [HM1.24xCD16] entwickelt zur Effektorzell-vermittelten Lyse von Myelomzellen. Nach Charakterisierung dieses Antikörpers konnte in Zytotoxizitätstests in vitro Lyse verschiedener Myelomzelllinien sowie an humanen primären Tumorzellen beobachtet werden über die Rekrutierung CD16-positiver Effektorzellen, vor allem NK-Zellen. Insgesamt erreichte der bsscFv eine höhere Effizienz als der monoklonale HM1.24-IgG1. Als nächster Schritt ist die funktionelle Untersuchung des bsscFv [HM1.24xCD16] im Mausmodell von großem Interesse, sowie die Weiterentwicklung bis zum klinischen Einsatz.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung, dessen Prognose durch die aktuellen therapeutischen Möglichkeiten deutlich gebessert, aber in der Regel weiterhin nicht heilbar ist. Die Entwicklung zusätzlicher immuntherapeutischer Strategien könnten ein möglicher Weg sein, um eine minimale Resterkrankung zu eliminieren und damit Langzeitremissionen zu erreichen. Ein vielversprechender Weg ist der Einsatz von Antikörpern. Bei der Therapie des Multiplen Myeloms spielten Antikörper bisher keine größere Rolle, da für Myelomzellen nur wenig geeignete Zielmoleküle definiert sind. HM1.24 wurde als ein Oberflächenmolekül identifiziert, welches auf terminal differenzierten B-Zellen hochexprimiert wird und auf Myelomzellen überexprimiert wird. Fc-Rezeptor-vermittelte Mechanismen wie ADCC spielen eine wichtige Rolle für die Antitumoraktivität von therapeutischen Antikörpern. Durch gezieltes Ansteuern aktivierender Fc-Rezeptoren lässt sich die therapeutische Effizienz von Antikörpern steigern. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Effektorzellrekrutierung bieten bispezifische Antikörper, die mit hoher Affinität an den jeweiligen aktivierenden Fc-Rezeptor binden.

Die Effektorzell-vermittelte Lyse über HM1.24 kann möglicherweise durch Verwendung eines bispezifischen Antikörpers erhöht werden. In dieser Arbeit wurde ein rekombinanter bispezifischer single-chain Fv HM1.24xCD16 Antikörper (Tandem-Format) entwickelt, der die gezielte Rekrutierung von CD16-positiven Zellen ermöglicht. Ein bispezifischer single-chain Fv HM1.24 x CD16 ist durch seine beiden Antigenbindungsstellen in der Lage, HM1.24-positive Myelomzellen und CD16-positive Effektorzellen in räumliche Nähe zu bringen, und über die Aktivierung von diesen Effektorzellen, wie NK-Zellen und Makrophagen, eine zytotoxische Immunantwort mittels ADCC zu induzieren.

Zur Herstellung des bsscFv HM1.24xCD16 wurde das scFv Fragment von einem monoklonalen HM1.24 mit dem scFv Fragment gegen CD16 kloniert und rekombinant in 293T exprimiert. Anschließend erfolgte eine zweistufige Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie über den Hexahistidin-Tag und Strep-Tag. Durch Western-Blots und Coomassie wurde kontrolliert, ob die Expression sowie die Aufreinigung erfolgreich waren. Dabei wurde eine Bande bei ca 60-65kDa detektiert, was dem erwarteten Molekulargewicht des bsscFv entspricht. Die spezifische Bindung der aufgereinigten Proteine an ihre Zielantigene, HM1.24 und CD16,

wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen an Antigen-positiven Zellen als auch an Antigen-negativen Zellen untersucht. Als nächstes wurde der bispezifischen HM1.24xCD16 auf seine Fähigkeit untersucht, die spezifische Lyse HM1.24-positiver Zellen zu induzieren durch Rekrutierung von Effektorzellen. Der Antikörper wurde für Zytotoxizitätsuntersuchungen in Form eines ^{51}Cr -Release-Assay eingesetzt. Die Tests wurden mit frisch isolierten, unstimulierten mononukleären Zellen (MNC) aus verschiedenen gesunden Spendern und verschiedenen B-Zell-Linien/Myelomlinien sowie an primären humanen Tumorzellen durchgeführt. In vitro weist der bsscFv HM1.24xCD16 an verschiedenen Zelllinien (ARH-77, RPMI 8226, INA-6, U266, primäre humane Tumorzellen) eine höhere Lyserate auf im Vergleich zum monoklonalen HM1.24. Auch in Untersuchungen, die in Abhängigkeit der eingesetzten Antikörperkonzentrationen sowie in Abhängigkeit des Effektor-zu-Target Verhältnisses durchgeführt wurden, zeigte sich der bsscFc dem monoklonalen Antikörper überlegen. Entsprechende Kontroll-Experimente mit blockierenden Antikörpern zeigen, dass die Lyse spezifisch über den bsscFv HM1.24xCD16 induziert wird.

Es wurde gezeigt, dass der rekombinante bsscFv HM1.24xCD16 NK-Zellen an Myelomzellen rekrutiert und durch zelluläre Zytotoxizität Tumorzelllyse induziert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Arndt, M. A., Krauss, J., Kipriyanov, S.M., Pfreundschuh, M. and Little, M.** (1999). "A bispecific diabody that mediates natural killer cell cytotoxicity against xenotransplanted human Hodgkin's tumors." *Blood* **94**(8): 2562-8.
- Arteaga, C. L.** (2003). "Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer." *Breast Cancer Res* **5**(2): 96-100.
- Baluk, P., Hashizume, H. and McDonald, D.M.** (2005). "Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer." *Curr Opin Genet Dev* **15**(1): 102-11.
- Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchinger, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmüller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, A. and Kufer, P.** (2008). "Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody." *Science* **321**(5891): 974-7.
- Baum, W., Steininger, H., Bair, H.J., Becker, W., Hansen-Hagge, T.E., Kressel, M., Kremmer, E., Kalden, J.R. and Gramatzki, M.** (1996). "Therapy with CD7 monoclonal antibody TH-69 is highly effective for xenografted human T-cell ALL." *Br J Haematol* **95**(2): 327-38.
- Blade, J., Samson, D., Reece, D., Apperley, J., Björkstrand, B., Gahrton, G., Gertz, M., Giralt, S., Jagannath, S. and Vesole, D.** (1998). "Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. Myeloma Subcommittee of the EBMT. European Group for Blood and Marrow Transplant." *Br J Haematol* **102**(5): 1115-23.
- Boulianne, G. L., Hozumi, N. and Shulman, M.J.** (1984). "Production of functional chimaeric mouse/human antibody." *Nature* **312**(5995): 643-6.
- Brissinck, J., Demanet, C., Moser, M., Leo, O. and Thielemans, K.** (1991). "Treatment of mice bearing BCL1 lymphoma with bispecific antibodies." *J Immunol* **147**(11): 4019-26.
- Broders, O., Breitling, F. and Dubel, S.** (2003). "Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display." *Methods Mol Biol* **205**: 295-302.
- Bruenke, J., Barbin, K., Kunert, S., Lang, P., Pfeiffer, M., Stieglmaier, K., Niethammer, D., Stockmeyer, B., Peipp, M., Repp, R., Valerius, T. and Fey, G.H.** (2005). "Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcγRIII (CD16)." *Br J Haematol* **130**(2): 218-28.
- Bruenke, J., Fischer, B., Barbin, K., Schreiter, K., Wachter, Y., Mahr, K., Titgemeyer, F., Niederweis, M., Peipp, M., Zunino, S.J., Repp, R., Valerius, T. and Fey, G.H.** (2004). "A recombinant bispecific single-chain Fv antibody against HLA class II and FcγRIII (CD16) triggers effective lysis of lymphoma cells." *Br J Haematol* **125**(2): 167-79.
- Burger, R., Guenther, A., Bakker, F., Schmalzing, M., Bernand, S., Baum, W., Duerr, B., Hocke, G.M., Steininger, H., Gebhart, E. and Gramatzki, M.** (2001). "Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma." *Hematol J* **2**(1): 42-53.

- Canevari, S., Mezzanzanica, D., Mazzoni, A., Negri, D.R., Ramakrishna, V., Bolhuis, R.L., Colnaghi, M.I. and Bolis, G.** (1995). "Bispecific antibody targeted T cell therapy of ovarian cancer: clinical results and future directions." J Hematother **4**(5): 423-7.
- Capstick, P.B.** (1963). "Growth of baby hamster kidney cells in suspension". Proc R Soc Med **56**: 1062-4.
- Carter, P.** (2001). "Bispecific human IgG by design." J Immunol Methods **248**(1-2): 7-15.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P. and Watier, H.** (2002). "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene." Blood **99**(3): 754-8.
- Chaouchi, N., Vazquez, A., Galanaud, P. and Leprince, C.** (1995). "B cell antigen receptor-mediated apoptosis. Importance of accessory molecules CD19 and CD22, and of surface IgM cross-linking." J Immunol **154**(7): 3096-104.
- Chester, K., Pedley, B., Tolner, B., Violet, J., Mayer, A., Sharma, S., Boxer, G., Green, A., Nagl, S. and Begent, R.** (2004). "Engineering antibodies for clinical applications in cancer." Tumour Biol **25**(1-2): 91-8.
- Chng, W. J., Lau, L.G., Yusof, N. and Mow, B.M.** (2005). "Targeted therapy in multiple myeloma." Cancer Control **12**(2): 91-104.
- Clark, M.** (2000). "Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'?" Immunol Today **21**(8): 397-402.
- Clynes, R. A., Towers, T.L., Presta, L.G. and Ravetch, J.V.** (2000). "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets." Nat Med **6**(4): 443-6.
- Curnow, R. T.** (1997). "Clinical experience with CD64-directed immunotherapy. An overview." Cancer Immunol Immunother **45**(3-4): 210-5.
- Daeron, M.** (1997). "Fc receptor biology." Annu Rev Immunol **15**: 203-34.
- Dechant, M., Vidarsson, G., Stockmeyer, B., Repp, R., Glennie, M.J., Gramatzki, M., van de Winkel, J.G. and Valerius, T.** (2002). "Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing." Blood **100**(13): 4574-80.
- Deo, Y. M., Graziano, R.F., Repp, R. and van de Winkel, J.G.** (1997). "Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies." Immunol Today **18**(3): 127-35.
- Diehl, V., Schaadt, M., Kirchner, H., Hellriegel, K.P., Gudat, F., Fonatsch, C., Laskewitz E. and Guggenheim, R.** (1978). "Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study." Blut **36**(6): 331-8.
- Downing, J. R. and Shannon, K.M.** (2002). "Acute leukemia: a pediatric perspective." Cancer Cell **2**(6): 437-45.
- Drewinko, B., Mars, W., Minowada, J., Burk, K.H. and Trujillo, J.M.** (1984). "ARH-77, an established human IgG-producing myeloma cell line. I. Morphology, B-cell phenotypic marker profile, and expression of Epstein-Barr virus." Cancer **54**(9): 1883-92.
- Dubel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Braunagel, M., Klewinghaus, I. and Little, M.** (1993). "A family of vectors for surface display and production of antibodies." Gene **128**(1): 97-101.
- Einsele, H. and Straka, C.** (2004). "Multiple myeloma: high-dose therapy and stem cell transplantation." Der Onkologe **10**: 832-42.

- Elsasser, D., Valerius, T., Repp, R., Weiner, G.J., Deo, Y., Kalden, J.R., van de Winkel, J.G., Stevenson, G.T., Glennie, M.J. and Gramatzki, M. (1996). "HLA class II as potential target antigen on malignant B cells for therapy with bispecific antibodies in combination with granulocyte colony-stimulating factor." Blood **87**(9): 3803-12.
- Eyrich, M., Lang, P., Lal, S., Bader, P., Handgretinger, R., Klingebiel, T., Niethammer, D. and Schleger, P.G. (2001). "A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a paediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors." Br J Haematol **114**(2): 422-32.
- Fanger, M.W. and Erbe, D.V. (1992). "Fc gamma receptors in cancer and infectious disease." Immunol Res **11**(3-4): 203-16.
- Fanger, M.W., Segal, D.M. and Romet-Lemonne, J.L. (1991). "Bispecific antibodies and targeted cellular cytotoxicity." Immunol Today **12**(2): 51-4.
- Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter, J. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-76.
- Fleit, H.B., Wright, S.D. and Unkeless, J.C. (1982). "Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(10): 3275-9.
- Garcia de Palazzo, I., Holmes, M., Gercel-Taylor, C. and Weiner, L.M. (1992). "Antitumor effects of a bispecific antibody targeting CA19-9 antigen and CD16." Cancer Res **52**(20): 5713-9.
- Gessner, J.E., Heiken, H., Tamm, A. and Schmidt, R.E. (1998). "The IgG Fc receptor family." Ann Hematol **76**(6): 231-48.
- Glennie, M.J. and Johnson, P.W. (2000). "Clinical trials of antibody therapy." Immunol Today **21**(8): 403-10.
- Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T. and Stevenson, G.T. (1987). "Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)2 antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments." J Immunol **139**(7): 2367-75.
- Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A. and Introna, M. (2001). "CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59." Blood **98**(12): 3383-9.
- Goto, T., Kennel, S.J., Abe, M., Takishita, M., Kosaka, M., Solomon, A. and Saito, S. (1994). "A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells." Blood **84**(6): 1922-30.
- Green, L.L. (1999). "Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies." J Immunol Methods **231**(1-2): 11-23.
- Greenstein, S., Krett, N.L., Kurosawa, Y., Ma, C., Chauhan, D., Hideshima, T., Anderson, K.C. and Rosen, S.T. (2003). "Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells." Exp Hematol **31**(4): 271-82.
- Greipp, P.R., San Miguel, J., Durie, B.G., Crowley, J.J., Barlogie, B., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Avet-Loiseau, H., Kyle, R.A., Lahuerta, J.J., Ludwig, H., Morgan, G., Powles, R., Shimizu, K., Shustik, C., Sonneveld, P., Tosi, P., Turesson, I. and Westin, J. (2005). "International staging system for multiple myeloma." J Clin Oncol **23**(15): 3412-20.

- Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Gordon, P. and Niethammer, D.** (2003). "Megadose transplantation of highly purified haploidentical stem cells: current results and future prospects." Pediatr Transplant **7 Suppl 3**: 51-5.
- Harousseau, J.L., Shaughnessy, J., Jr. and Richardson, P.** (2004). "Multiple myeloma." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 237-56.
- Harris, J.M. and Chess, R.B.** (2003). "Effect of pegylation on pharmaceuticals." Nat Rev Drug Discov **2**(3): 214-21.
- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., da Costa, L., Tembrink, S., Held, G., Sek, A., Konig, J., Bauer, S., Kloft, M. and Pfreundschuh, M.** (2001). "Anti-CD16/CD30 bispecific antibody treatment for Hodgkin's disease: role of infusion schedule and costimulation with cytokines." Clin Cancer Res **7**(7): 1873-81.
- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., Eichentopf, B., Kloft, M. and Pfreundschuh, M.** (1997). "Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody." Blood **89**(6): 2042-7.
- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Sahin, U. and Pfreundschuh, M.** (1996). "Treatment of Hodgkin's disease with bispecific antibodies." Ann Oncol **7 Suppl 4**: 143-6.
- Holliger, P., Prospero, T. and Winter, G.** (1993). "'Diabodies': small bivalent and bispecific antibody fragments." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6444-8.
- Hombach, A., Jung, W., Pohl, C., Renner, C., Sahin, U., Schmits, R., Wolf, J., Kapp, U., Diehl, V. and Pfreundschuh, M.** (1993). "A CD16/CD30 bispecific monoclonal antibody induces lysis of Hodgkin's cells by unstimulated natural killer cells in vitro and in vivo." Int J Cancer **55**(5): 830-6.
- Honemann, D., Chatterjee, M., Savino, R., Bommert, K., Burger, R., Gramatzki, M., Dorken, B. and Bargou, R.C.** (2001). "The IL-6 receptor antagonist SANT-7 overcomes bone marrow stromal cell-mediated drug resistance of multiple myeloma cells." Int J Cancer **93**(5): 674-80.
- International Myeloma Working Group** (2003). "Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group." Br J Haematol **121**(5): 749-57.
- Ishikawa, J., Kaisho, T., Tomizawa, H., Lee, B.O., Kobune, Y., Inazawa, J., Oritani, K., Itoh, M., Ochi, T. and Ishihara, K.** (1995). "Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth." Genomics **26**(3): 527-34.
- Jaffers, G.J., Fuller, T.C., Cosimi, A.B., Russell, P.S., Winn, H.J. and Colvin, R.B.** (1986). "Monoclonal antibody therapy. Anti-idiotypic and non-anti-idiotypic antibodies to OKT3 arising despite intense immunosuppression." Transplantation **41**(5): 572-8.
- Karpovsky, B., Titus, J.A., Stephany, D.A. and Segal, D.M.** (1984). "Production of target-specific effector cells using hetero-cross-linked aggregates containing anti-target cell and anti-Fc gamma receptor antibodies." J Exp Med **160**(6): 1686-701.
- Kawai, S., Koishihara, Y., Iida, S., Ozaki, S., Matsumoto, T., Kosaka, M. and Yamada-Okabe, H.** (2006). "Construction of a conventional non-radioisotope method to quantify HM1.24 antigens: correlation of HM1.24 levels and ADCC activity of the humanized antibody against HM1.24." Leuk Res **30**(8): 949-56.

- Kawai, S., Yoshimura, Y., Iida, S., Kinoshita, Y., Koishihara, Y., Ozaki, S., Matsumoto, T., Kosaka, M. and Yamada-Okabe, H. et al. (2006). "Antitumor activity of humanized monoclonal antibody against HM1.24 antigen in human myeloma xenograft models." Oncol Rep **15**(2): 361-7.
- Khazaeli, M.B., Conry, R.M. and LoBuglio, A.F. (1994). "Human immune response to monoclonal antibodies." J Immunother Emphasis Tumor Immunol **15**(1): 42-52.
- Kipriyanov, S.M., Cochlovius, B., Schafer, H.J., Moldenhauer, G., Bahre, A., Le Gall, F., Knackmuss, S. and Little, M. (2002). "Synergistic antitumor effect of bispecific CD19 x CD3 and CD19 x CD16 diabodies in a preclinical model of non-Hodgkin's lymphoma." J Immunol **169**(1): 137-44.
- Koene, H.R., de Haas, M., Kleijer, M., Roos, D. and von dem Borne, A.E. (1996). "NA-phenotype-dependent differences in neutrophil Fc gamma RIIIb expression cause differences in plasma levels of soluble Fc gamma RIII." Br J Haematol **93**(1): 235-41.
- Kontermann, R.E. (2005). "Recombinant bispecific antibodies for cancer therapy." Acta Pharmacol Sin **26**(1): 1-9.
- Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R. and Pluckthun, A. (1997). "Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system." J Immunol Methods **201**(1): 35-55.
- Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A. Banting, G. (2003). "Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology." Traffic **4**(10): 694-709.
- Kuroiwa, Y., Kasinathan, P., Choi, Y.J., Naeem, R., Tomizuka, K., Sullivan, E.J., Knott, J.G., Duteau, A., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., Ishida, I. and Robl, J.M. (2002). "Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin." Nat Biotechnol **20**(9): 889-94.
- Kyle, R.A. (1993). "'Benign' monoclonal gammopathy--after 20 to 35 years of follow-up." Mayo Clin Proc **68**(1): 26-36.
- Kyle, R.A. and Rajkumar, S.V. (2008). "Multiple myeloma." Blood **111**(6): 2962-72.
- Kyle, R.A., Remstein, E.D., Therneau, T.M. Dispenzieri, A., Kurtin, P.J., Hodnefield, J.M., Larson, D.R., Plevak, M.F., Jelinek, D.F., Fonseca, R., Melton, L.J., 3rd and Rajkumar, S.V. (2007). "Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma." N Engl J Med **356**(25): 2582-90.
- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature, **227**, 680-85
- Lamers, C.H., Bolhuis, R.L., Warnaar, S.O., Stoter, G. and Gratama, J.W. (1997). "Local but no systemic immunomodulation by intraperitoneal treatment of advanced ovarian cancer with autologous T lymphocytes re-targeted by a bi-specific monoclonal antibody." Int J Cancer **73**(2): 211-9.
- Lang, P., Barbin, K., Feuchtinger, T., Greil, J., Peipp, M., Zunino, S.J., Pfeiffer, M., Handgretinger, R., Niethammer, D. and Fey, G.H. (2004). "Chimeric CD19 antibody mediates cytotoxic activity against leukemic blasts with effector cells from pediatric patients who received T-cell-depleted allografts." Blood **103**(10): 3982-5.
- Lazar, G.A., Dang, W., Karki, S., Vafa, O., Peng, J.S., Hyun, L., Chan, C., Chung, H.S., Eivazi, A., Yoder, S.C., Vielmetter, J., Carmichael, D.F., Hayes, R.J. and Dahiyat, B.I. (2006).

- "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4005-10.
- Link, B.K., Kostelny, S.A., Cole, M.S., Fusselman, W.P., Tso, J.Y. and Weiner, G.J.** (1998). "Anti-CD3-based bispecific antibody designed for therapy of human B-cell malignancy can induce T-cell activation by antigen-dependent and antigen-independent mechanisms." Int J Cancer **77**(2): 251-6.
- Little, M., Breitling, F., Dubel, S., Fuchs, P. and Braunagel, M.** (1995). "Human antibody libraries in *Escherichia coli*." J Biotechnol **41**(2-3): 187-95.
- Lonberg, N. and Huszar, D.** (1995). "Human antibodies from transgenic mice." Int Rev Immunol **13**(1): 65-93.
- Lubin, I., Segall, H., Marcus, H., David, M., Kulova, L., Steinitz, M., Erlich, P., Gan, J. and Reisner, Y.** (1994). "Engraftment of human peripheral blood lymphocytes in normal strains of mice." Blood **83**(8): 2368-81.
- Mack, M., Riethmuller, G. and Kufer, P.** (1995). "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7021-5.
- Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D. and Winter, G.** (1991). "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J Mol Biol **222**(3): 581-97.
- Matsuoka, Y., Moore, G.E., Yagi, Y. and Pressman, D.** (1967). "Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma." Proc Soc Exp Biol Med **125**(4): 1246-50.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., Jack, H.M. and Voll, R.E.** (2007). "Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition." Cancer Res **67**(4): 1783-92.
- Mertens, N., Devos, F., Leoen, J., van Deynse, E., Willems, A., Schoonooghe, S., Burvenich, I., de Koker, S., Vlieghe, D., Grooten, J., Kelly, A. and van de Wiele, C.** (2004). "New strategies in polypeptide and antibody synthesis: an overview." Cancer Biother Radiopharm **19**(1): 99-109.
- Milstein, C. and Cuello, A.C.** (1983). "Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry." Nature **305**(5934): 537-40.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A. and Oi, V.T.** (1984). "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(21): 6851-5.
- Muller, D., Karle, A., Meissburger, B., Hofig, I., Stork, R. and Kontermann, R.E.** (2007). "Improved pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin." J Biol Chem **282**(17): 12650-60.
- Muller, K.M., Arndt, K.M. and Pluckthun, A.** (1998). "A dimeric bispecific miniantibody combines two specificities with avidity." FEBS Lett **432**(1-2): 45-9.
- Neil, S.J., Zang, T. and Bieniasz, P.D.** (2008). "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu." Nature **451**(7177): 425-30.
- Neubauer, M.A., Benyunes, M.C., Thompson, J.A., Bensinger, W.I., Lindgren, C.G., Buckner, C.D. and Fefer, A.** (1994). "Lymphokine-activated killer (LAK) precursor cell activity is present in

- infused peripheral blood stem cells and in the blood after autologous peripheral blood stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **13**(3): 311-6.
- Newman, R., Alberts, J., Anderson, D., Carner, K., Heard, C., Norton, F., Raab, R., Reff, M., Shuey, S. and Hanna, N.** (1992). "'Primatization' of recombinant antibodies for immunotherapy of human diseases: a macaque/human chimeric antibody against human CD4." Biotechnology (N Y) **10**(11): 1455-60.
- Nilsson, K., Bennich, H., Johansson, S.G. and Ponten, J.** (1970). "Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient." Clin Exp Immunol **7**(4): 477-89.
- Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K. and Ravetch, J.V.** (2005). "FcγR4: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity." Immunity **23**(1): 41-51.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J.V.** (2007). "Antibodies, Fc receptors and cancer." Curr Opin Immunol **19**(2): 239-45.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J.V.** (2008 a). "Analyzing antibody-Fc-receptor interactions." Methods Mol Biol **415**: 151-62.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J.V.** (2008 b). "Fcγ receptors as regulators of immune responses." Nat Rev Immunol **8**(1): 34-47.
- Ohtomo, T., Sugamata, Y., Ozaki, Y., Ono, K., Yoshimura, Y., Kawai, S., Koishihara, Y., Ozaki, S., Kosaka, M., Hirano, T. and Tsuchiya, M.** (1999). "Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells." Biochem Biophys Res Commun **258**(3): 583-91.
- Ono, K., Ohtomo, T., Yoshida, K., Yoshimura, Y., Kawai, S., Koishihara, Y., Ozaki, S., Kosaka, M. and Tsuchiya, M.** (1999). "The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity." Mol Immunol **36**(6): 387-95.
- Osgood, E.E.** (1960). "The survival time of patients with plasmocytic myeloma." Cancer Chemother Rep **9**: 1-10.
- Ozaki, S., Kosaka, M., Wakahara, Y., Ozaki, Y., Tsuchiya, M., Koishihara, Y., Goto, T. and Matsumoto, T.** (1999). "Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells." Blood **93**(11): 3922-30.
- Ozaki, S., Kosaka, M., Wakatsuki, S., Abe, M., Koishihara, Y. and Matsumoto, T.** (1997). "Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24." Blood **90**(8): 3179-86.
- Pear, W., Nolan, G., Scott, M. and Baltimore, D.** (1993) "Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection." Cell Biology **90** : 8392-96.
- Peipp, M. and Valerius, T.** (2002). "Bispecific antibodies targeting cancer cells." Biochem Soc Trans **30**(4): 507-11.
- Peipp, M., de Weers, M., Beyer, T., Repp, R., Parren, P., Valerius, T. and van de Winkel, J.G.** (2005). "Fully Human CD38 Antibodies Efficiently Trigger ADCC of Multiple Myeloma Cell Lines and Primary Tumor Cells." Blood **106**: 3377a.
- Peipp, M., Beyer, T., Dechant, M. and Valerius, T.** (2007). Section I (1.Edition): Selecting and Shaping the Antibody Molecule: Molecular Engineering III: Fc. Handbook of Therapeutic Antibodies. S. Dübel, Wiley. **1.**, Volume 1, S.171

- Press, O.W.** (1999). "Monoclonal antibody therapy for indolent Non-Hodgkin's Lymphomas. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 305-311.
- Presta, L.G., Chen, H., O'Connor, S.J., Chisholm, V., Meng, Y.G., Krummen, L., Winkler, M. and Ferrara, N.** (1997). "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders." Cancer Res **57**(20): 4593-9.
- Puck, T.T.** (1958). "Growth and genetics in somatic mammalian cells in vitro." J Cell Physiol Suppl **52**(Supp 1): 287-302; discussion 302-11.
- Pulvertaft, J.V.** (1964). "Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma)." Lancet **1**(7327): 238-40.
- Ravetch, J.V. and Kinet, J.P.** (1991). "Fc receptors." Annu Rev Immunol **9**: 457-92.
- Ravetch, J.V. and Perussia, B.** (1989). "Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions." J Exp Med **170**(2): 481-97.
- Rebello, P.R., Hale, G., Friend, P.J., Cobbold, S.P. and Waldmann, H.** (1999). "Anti-globulin responses to rat and humanized CAMPATH-1 monoclonal antibody used to treat transplant rejection." Transplantation **68**(9): 1417-20.
- Renner, C., Jung, W., Sahin, U., Denfeld, R., Pohl, C., Trumper, L., Hartmann, F., Diehl, V., van Lier, R. and Pfreundschuh, M.** (1994). "Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells." Science **264**(5160): 833-5.
- Renner, C. and Pfreundschuh, M.** (1995). "Treatment of heterotransplanted Hodgkin's tumors in SCID mice by a combination of human NK or T cells and bispecific antibodies." J Hematother **4**(5): 447-51.
- Repp, R., Valerius, T. and Bargou, R.** (2001). "[Bispecific antibodies in hematology and oncology]." Internist (Berl) **42**(6): 854-9.
- Repp, R., Valerius, T., Sendler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R. and Platzter, E.** (1991). "Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor." Blood **78**(4): 885-9.
- Repp, R., van Ojik, H.H., Valerius, T., Groenewegen, G., Wieland, G., Oetzel, C., Stockmeyer, B., Becker, W., Eisenhut, M., Steininger, H., Deo, Y.M., Blijham, G.H., Kalden, J.R., van de Winkel, J.G. and Gramatzki, M.** (2003). "Phase I clinical trial of the bispecific antibody MDX-H210 (anti-FcgammaRI x anti-HER-2/neu) in combination with Filgrastim (G-CSF) for treatment of advanced breast cancer." Br J Cancer **89**(12): 2234-43.
- Ridgway, J.B., Presta, L.G. and Carter, P.** (1996). "'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization." Protein Eng **9**(7): 617-21.
- Ritter, G., Cohen, L.S., Williams, C., Jr., Richards, E.C., Old, L.J. and Welt, S.** (2001). "Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33." Cancer Res **61**(18): 6851-9.
- Sambrook, J. and Russell, D.W.** (2001). "Molecular Cloning: A laboratory manual" Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (United States of America)
- Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Present, D.H., Sutherland, L.R., Kamm, M.A., Wolf, D.C., Baker, J.P., Hawkey, C., Archambault, A., Bernstein, C.N., Novak, C., Heath, P.K. and Targan, S.R.** (2001). "An engineered human antibody to TNF (CDP571) for active Crohn's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial." Gastroenterology **120**(6): 1330-8.

- Sapra, P., Stein, R., Pickett, J., Qu, Z. Govindan, S.V., Cardillo, T.M., Hansen, H.J., Horak, I.D., Griffiths, G.L. and Goldenberg, D.M. (2005). "Anti-CD74 antibody-doxorubicin conjugate, IMMU-110, in a human multiple myeloma xenograft and in monkeys." Clin Cancer Res **11**(14): 5257-64.
- Schoonjans, R., Willems, A., Schoonoghe, S., Fiers, W., Grooten, J. and Mertens, N. (2000). "Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives." J Immunol **165**(12): 7050-7.
- Schoonjans, R., Willems, A., Schoonoghe, S., Leoen, J., Grooten, J. and Mertens, N. et al. (2001). "A new model for intermediate molecular weight recombinant bispecific and trispecific antibodies by efficient heterodimerization of single chain variable domains through fusion to a Fab-chain." Biomol Eng **17**(6): 193-202.
- Schroff, R.W., Foon, K.A., Beatty, S.M., Oldham, R.K. and Morgan, A.C., Jr. (1985). "Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy." Cancer Res **45**(2): 879-85.
- Segal, D.M., Weiner, G.J. and Weiner, L.M. (1999). "Bispecific antibodies in cancer therapy." Curr Opin Immunol **11**(5): 558-62.
- Sekimoto, E., Ozaki, S., Ohshima, T., Shibata, H., Hashimoto, T., Abe, M., Kimura, N., Hattori, K., Kawai, S., Kinoshita, Y., Yamada-Okabe, H., Tsuchiya, M. and Matsumoto, T. (2007). "A single-chain Fv diabody against human leukocyte antigen-A molecules specifically induces myeloma cell death in the bone marrow environment." Cancer Res **67**(3): 1184-92.
- Shan, D., Ledbetter, J.A. and Press, O.W. (1998). "Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies." Blood **91**(5): 1644-52.
- Shawler, D.L., Bartholomew, R.M., Smith, L.M. and Dillman, R.O. (1985). "Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG." J Immunol **135**(2): 1530-5.
- Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., Weikert, S.H. and Presta, L.G. (2002). "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity." J Biol Chem **277**(30): 26733-40.
- Shields, R.L., Namenuk, A.K., Hong, K., Meng, Y.G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J.A. and Presta, L.G. (2001). "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γRI, Fc γRII, Fc γRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γRIII." J Biol Chem **276**(9): 6591-604.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., Hanai, N. and Shitara, K. (2003). "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity." J Biol Chem **278**(5): 3466-73.
- Silva, M.R., Parreira, A. and Ascensao, J.L. (1995). "Natural killer cell numbers and activity in mobilized peripheral blood stem cell grafts: conditions for in vitro expansion." Exp Hematol **23**(14): 1676-81.
- Simmons, D. and Seed, B. (1988). "The Fc γRIII receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein." Nature **333**(6173): 568-70.
- Singhal, S. and Mehta, J. (2006). "Multiple myeloma." Clin J Am Soc Nephrol **1**(6): 1322-30.

- Stein, R., Qu, Z., Cardillo, T.M., Chen, S., Rosario, A., Horak, I.D., Hansen, H.J. and Goldenberg, D.M. (2004). "Antiproliferative activity of a humanized anti-CD74 monoclonal antibody, hLL1, on B-cell malignancies." Blood **104**(12): 3705-11.
- Stevenson, G.T. (2006). "CD38 as a therapeutic target." Mol Med **12**(11-12): 345-6.
- Stockmeyer, B., Dechant, M., van Egmond, M., Tutt, A.L., Sundarapandiyam, K., Graziano, R.F., Repp, R., Kalden, J.R., Gramatzki, M., Glennie, M.J., van de Winkel, J. and Valerius, T. (2000). "Triggering Fc alpha-receptor I (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20-directed antibody therapy." J Immunol **165**(10): 5954-61.
- Tai, Y.T., Catley, L.P., Mitsiades, C.S., Burger, R., Podar, K., Shringpaure, R., Hideshima, T., Chauhan, D., Hamasaki, M., Ishitsuka, K., Richardson, P., Treon, S.P., Munshi, N.C. and Anderson, K.C. (2004). "Mechanisms by which SGN-40, a humanized anti-CD40 antibody, induces cytotoxicity in human multiple myeloma cells: clinical implications." Cancer Res **64**(8): 2846-52.
- Tai, Y.T., Dillon, M., Song, W., Leiba, M., Li, X.F., Burger, P., Lee, A.I., Podar, K., Hideshima, T., Rice, A.G., van Abbema, A., Jesaitis, L., Caras, I., Law, D., Weller, E., Xie, W., Richardson, P., Munshi, N.C., Mathiot, C., Avet-Loiseau, H., Afar, D.E. and Anderson, K.C. (2008). "Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu." Blood **112**(4): 1329-37.
- Tai, Y.T., Li, X., Tong, X., Santos, D., Otsuki, T., Catley, L., Tournilhac, O., Podar, K., Hideshima, T., Schlossman, R., Richardson, P., Munshi, N.C., Luqman, M. and Anderson, K.C. (2005). "Human anti-CD40 antagonist antibody triggers significant antitumor activity against human multiple myeloma." Cancer Res **65**(13): 5898-906.
- Tan, P., Mitchell, D.A., Buss, T.N., Holmes, M.A., Anasetti, C. and Foote, J. (2002). ""Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity-determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28." J Immunol **169**(2): 1119-25.
- Tassone, P., Goldmacher, V.S., Neri, P., Gozzini, A., Shamma, M.A., Whiteman, K.R., Hylander-Gans, L.L., Carrasco, D.R., Hideshima, T., Shringarpure, R., Shi, J., Allam, C.K., Wijdenes, J., Venuta, S., Munshi, N.C. and Anderson, K.C. (2004). "Cytotoxic activity of the maytansinoid immunoconjugate B-B4-DM1 against CD138+ multiple myeloma cells." Blood **104**(12): 3688-96.
- Tassone, P., Gozzini, A., Goldmacher, V., A., Shamma, M.A., Whiteman, K.R., Carrasco, D.R., Li, C., Allam, C.K., Venuta, S., Anderson, K.C. and Munshi, N.C. (2004). "In vitro and in vivo activity of the maytansinoid immunoconjugate huN901-N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansine against CD56+ multiple myeloma cells." Cancer Res **64**(13): 4629-36.
- Terpos, E., Rahemtulla, A. and Dimopoulos, M.A. (2005). "Current treatment options for myeloma." Expert Opin Pharmacother **6**(7): 1127-42.
- Thorpe, S.J., Turner, C., Heath, A., Feavers, I., Vatn, I., Natvig, J.B. and Thompson, K.M. (2003). "Clonal analysis of a human antimouse antibody (HAMA) response." Scand J Immunol **57**(1): 85-92.
- Valerius, T., Stockmeyer, B., van Spriel, A.B., Graziano, R.F., van den Herik-Oudijk, I.E., Repp, R., Deo, Y.M., Lund, J., Kalden, J.R., Gramatzki, M. and van de Winkel, J.G. (1997). "FcalphaRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy." Blood **90**(11): 4485-92.

- van de Winkel, J.G. and Anderson, C.L. (1991). "Biology of human immunoglobulin G Fc receptors." J Leukoc Biol **49**(5): 511-24.
- Vaughan, T.J., Osbourn, J.K. and Tempest, P.R. (1998). "Human antibodies by design." Nat Biotechnol **16**(6): 535-9.
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. and Johnson, K.S. (1996). "Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library." Nat Biotechnol **14**(3): 309-14.
- Wang, W., Nishioka, Y., Ozaki, S., Jalili, A., Verma, V.K., Hanibuchi, M., Abe, S., Minakuchi, K., Matsumoto, T. and Sone, S. (2008). "Chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells." Lung Cancer.
- Weber, J. (2007). "Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events." Oncologist **12**(7): 864-72.
- Weiner, G.J. and Hillstrom, J.R. (1991). "Bispecific anti-idiotypic/anti-CD3 antibody therapy of murine B cell lymphoma." J Immunol **147**(11): 4035-44.
- Weiner, L.M., Alpaugh, R.K., Amoroso, A.R., Adams, G.P., Ring, D.B. and Barth, M.W. (1996). "Human neutrophil interactions of a bispecific monoclonal antibody targeting tumor and human Fc gamma RIII." Cancer Immunol Immunother **42**(3): 141-50.
- Weiner, L.M., Clark, J.I., Davey, M., Li, W.S., Garcia de Palazzo, I., Ring, D.B. and Alpaugh, R.K. (1995). "Phase I trial of 2B1, a bispecific monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII." Cancer Res **55**(20): 4586-93.
- Weng, W.K. and Levy, R. (2001). "Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma." Blood **98**(5): 1352-7.
- Weng, W.K. and Levy, R. (2003). "Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma." J Clin Oncol **21**(21): 3940-7.
- Wiesmann, C., Fuh, G., Christinger, H.W., Eigenbrot, C., Wells, J.A. and de Vos, A.M. (1997). "Crystal structure at 1.7 Å resolution of VEGF in complex with domain 2 of the Flt-1 receptor." Cell **91**(5): 695-704.
- Woof, J.M. (2005). "Immunology. Tipping the scales toward more effective antibodies." Science **310**(5753): 1442-3.
- Wu, A.M., Chen, W., Raubitschek, A., Williams, L.E., Neumaier, M., Fischer, R., Hu, S.Z., Odom-Maryon, T., Wong, J.Y. and Shively, J.E. (1996). "Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers." Immunotechnology **2**(1): 21-36.
- Yang, J., Qian, J., Wezeman, M., Wang, S., Lin, P., Wang, M., Yaccoby, S., Kwak, L.W., Barlogie, B. and Yi, Q. (2006). "Targeting beta2-microglobulin for induction of tumor apoptosis in human hematological malignancies." Cancer Cell **10**(4): 295-307.
- Yoshio-Hoshino, N., Adachi, Y., Aoki, C., Pereboev, A., Curiel, D.T. and Nishimoto, N. (2007). "Establishment of a new interleukin-6 (IL-6) receptor inhibitor applicable to the gene therapy for IL-6-dependent tumor." Cancer Res **67**(3): 871-5.

7 WEITERE INFORMATIONSQUELLEN

Internetseiten:

Multiple Myeloma Research Foundation

<http://www.multiplemyeloma.org>

Kompetenznetz maligne Lymphome

<http://www.lymphome.de>

Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie

<http://www.dgho.de>

The International Immunogenetics Information SystemsTM

<http://imgt.cines.fr/textes/IMGTrepertoire/GenesClinical>

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. R. Repp und Herrn Prof. Dr. Gramatzki für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit, sowie für ihren wissenschaftlichen Rat, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und dafür, dass immer genügend Spielraum zur freien Gestaltung des Projekts vorhanden war.

Bei Dr. Matthias Peipp möchte ich mich ganz herzlich für seine grenzenlose Geduld und intensive Unterstützung rund um die gesamte Arbeit bedanken, sowie für die tolle Atmosphäre und das freundschaftliche Verhältnis im Laboralltag.

Bei Herrn Prof. Dr. Gramatzki, Dr. Günther, PD Dr. Humpe, Prof. Dr. Valerius, Dr. Matthias Staudinger und PD Dr. Renate Burger möchte ich mich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit, ihre Unterstützung sowie ihr Interesse an dieser Arbeit bedanken.

Anja Muskulus, Katrin Richter sowie allen anderen Labormitarbeitern danke ich für die stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft und ihre ausgezeichnete Arbeit im Labor. Weiterhin bedanke ich mich bei ihnen sowie bei den anderen Doktoranden für die schöne und freundschaftliche Stimmung im Laboralltag.

Allen Mitarbeitern und Kollegen der Sektion für Immun- und Stammzelltherapie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit.

Den Koreferenten möchte ich für die Begutachtung sowie das Interesse an meiner Arbeit danken.

Meinen Freunden danke ich ganz besonders für ihr offenes Ohr, ihr Verständnis und ihre aufbauenden Worte sowie der Bereitstellung von Materialien (Blut) für meine Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder sowie meiner Oma, deren uneingeschränkter Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte und dafür, dass sie mir die Möglichkeit zum Studium sowie zur Promotion ermöglicht haben.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Claudia Ehlert

Geboren am 10.06.1980 in Pritzwalk (Prignitz, Brandenburg)

Familienstand: Ledig

Schulbildung

1987 - 1993	Gesamtschule Pritzwalk
1993 - 2000	Johann-Wolfgang-von-Goethe Gymnasium, Pritzwalk Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2000 - 2002	Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Fachhochschule Nordostniedersachsen, Lüneburg Abschluss: Vordiplom
10/2002 - 05/2009	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel
08/2004	Ärztliche Vorprüfung
08/2007 – 07/2008	Praktisches Jahr: Innere Medizin: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel Chirurgie: Diakonissen-Krankenhaus Flensburg, Sunnybrook Sciences Health Centre Toronto, Kanada Neurologie: Friedrich-Ebert-Krankenhaus Neumünster
05/2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Facharztausbildung

Ab 10/2009	Facharztausbildung für Innere Medizin, Kreiskrankenhäuser Rendsburg-Eckernförde GmbH
------------	---

Promotion

06/2006 - 2009	Dissertation in der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie an der Universitätsklinik Schleswig-Holstein in Kiel Thema: „HM1.24 gerichteter bispezifischer single-chain Fv Antikörper zur Therapie des Multiplen Myeloms“ Betreuer: PD Dr. Roland Repp, Dr. Matthias Peipp
----------------	---

PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten:

Peipp, M. *, Ehlert, C. *, Staudinger, M., Muskulus, A., Kellner, C., Mohseni Nodehi, S., Glorius, P., Dechant, M., Burger, R., Brünke, J., Fey, G.H., Gramatzki, M. and Repp, R. (2009). „A novel recombinant bispecific antibody targeting HM1.24 on multiple myeloma”. Zur Publikation eingereicht.

(* geteilte Erstautorenschaft)

Schub, N., Günther, A., Schrauder, A., Claviez, A., Ehlert, C., Gramatzki, M. and Repp, R. (2009). „Therapy of Steroid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease with CD52 Antibody Alemtuzumab is Effective”. Zur Publikation eingereicht bei Bone Marrow Transplantation.

Zitierfähige Abstracts:

Vortrag:

Ehlert, C., Peipp, M., Staudinger, M., Brünke, J., Fey, G., Gramatzki, M. and Repp, R.. „Efficient lysis of myeloma cells by CD16 positive NK cells with recombinant single chain bispecific antibodies targeting HM1.24”. Vortrag auf der Gemeinsamen Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie Basel/Schweiz, 5. – 9. Oktober 2007; Onkologie 2007; 30 (suppl.3) 1-244.

Poster:

Peipp, M., Ehlert, C., Staudinger, M., Bruenke, J., Fey, G., Gramatzki, M. and Repp, R.. ”Efficient Lysis of Myeloma Cells by CD16 Positive Effector Cells with Recombinant Single Chain Bispecific Antibodies Targeting HM1.24”. Poster auf dem 49. Kongress der American Society of Hematology (ASH) in Atlanta/USA, 08. – 11. Dezember 2007. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2007, 110: Abstract 2752

Peipp, M., Ehlert, C., Staudinger, M., Muskulus, A., Kellner, C., Mohseni Nodehi, S., Glorius, P., Dechant, M., Burger, R., Brünke, J., Fey, G., Gramatzki, M. and Repp, R.. “ A novel recombinant bispecific antibody targeting HM1.24 on Multiple Myeloma”. Poster auf dem 14. Kongress der European Hematology Association (EHA) in Berlin/Deutschland, 4. – 7. Juni 2009.

Gramatzki, M., Schub, N., Günther, A., Ehlert, C., Schrauder, A. and Repp, R.. ”Effective therapy of steroid-refractory acute GvHD with CD52 antibody alemtuzumab”. Poster auf der 35. Jahrestagung der European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) in Göteborg/Schweden, 29. März. 2009 - 01. April. 2009.

